

TRAITE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 janvier 2000 (17.01.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/01409	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PM9804PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 juin 1999 (14.06.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 12 juin 1998 (12.06.98)
Déposant BARBAN, Véronique	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

10 décembre 1999 (10.12.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Philippe Bécamel

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of history is essential for a full understanding of the present.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/49, C07K 14/16, A61K 39/21, C12N 15/63	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/66046 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1999 (23.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01409 (22) Date de dépôt international: 14 juin 1999 (14.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/07598 12 juin 1998 (12.06.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BARBAN, Véronique [FR/FR]; 3, rue Gustave Nadaud, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Connaught, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: HIV VIRUS MIMOTOPES (54) Titre: MIMOTOPES DU VIRUS HIV (57) Abstract <p>The invention concerns a peptide for therapeutic or prophylactic treatment of HIV infection, capable of reacting with an antibody specific of the HIV virus envelope and derived from a HIV positive patient belonging to the long term non-progressor group, comprising an amino acid sequence mimicking an antigen conformational epitope of said virus envelope without however corresponding to a continuous sequence of said antigen and capable of containing optionally one of the 11 amino acid sequences as specified in the description. The invention also concerns a peptide conjugate obtained by combining the peptide with a carrier molecule for reinforcing said peptide immunogenicity. The invention further concerns a recombinant vector comprising a functional expression cassette for expressing a polynucleotide coding for said peptide. The invention likewise concerns a therapeutic or prophylactic composition for HIV infection, in particular for vaccinal use, whereof the principle comprises said peptide, or as the case may be said peptide conjugate and/or a recombinant vector coding for said peptide. Finally the invention concerns the use of said peptide as reagent for diagnosing HIV infection and/or the proneness of subjects in contact with the virus for rapidly developing AIDS.</p> (57) Abrégé <p>Peptide pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'infection à HIV, capable de réagir avec un anticorps spécifique de l'enveloppe du virus HIV et provenant d'un patient HIV positif appartenant au groupe des "long term non progressor", comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de l'enveloppe dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène et pouvant contenir au choix l'une des 11 séquences en acides aminés telles que spécifiées dans l'invention. Conjugué du peptide selon l'invention résultant de l'association du peptide à une molécule porteuse pour renforcer l'immunogénicité dudit peptide. Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un poly nucléotide codant pour un peptide selon l'invention. Composition thérapeutique ou prophylactique de l'infection à HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe comprend un peptide selon l'invention, le cas échéant un conjugué de ce peptide et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide. Utilisation d'un peptide selon l'invention en tant que réactif pour le diagnostic de l'infection à HIV et/ou de la susceptibilité des sujets en contact avec le virus à développer rapidement un SIDA.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Caméroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Mimotopes du Virus HIV

Objet de l'invention

La présente invention se rapporte au traitement et à la prévention du virus HIV et notamment à tout peptide mimant de nouveaux épitopes conformationnels d'antigènes de l'enveloppe du virus HIV et à tout polynucléotide intégré dans un vecteur permettant l'expression desdits peptides et leur utilisation à des fins thérapeutiques, prophylactiques, notamment vaccinales, et/ou diagnostiques.

Domaine de l'invention

Le HIV est un virus enveloppé à ARN et représente l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA, dont l'issue est fatale à terme, caractérisé par une destruction progressive du système immunitaire et le développement concomitant d'infections micro biologiques mettant souvent en cause des germes opportunistes.

La majorité des individus développent un syndrome d'immunodéficience acquise dans les 10 années qui suivent la contamination. En effet, les réactions immunitaires en réponse à l'infection sont très souvent inadaptées et notamment celles qui sont dirigées contre les protéines d'enveloppe en raison même de la très grande variabilité du virus résultant de sa grande capacité à se multiplier, à muter et à se recombiner (Bangham C.R.M et al 1997 Lancet 350:1617-1621). La très grande variabilité du virus HIV permet d'échapper au contrôle par le système immunitaire et favorise ainsi la dissémination du virus. Cependant, des études épidémiologiques récentes ont montré que certaines personnes infectées pouvaient contenir leur infection, sans manifestations cliniques apparentes et sans signes biologiques d'immunosuppression pendant des périodes de temps supérieures à 10 années (Pilgrim A.K et al., 1997, J. Infect. Dis. 176: 924-932). Le sérum de ces personnes encore appelées "long-term non progressors" révèle la présence d'anticorps neutralisants contre des isolats primaires de virus HIV (Pilgrim A.K et al., 1997, J. Infect. Dis. 176: 924-932).

L'enveloppe du virus HIV, issue du produit d'expression du gène Env (gène de l'enveloppe), est synthétisée tout d'abord sous la forme d'une glycoprotéine Gp160 qui se clive ensuite en deux glycoprotéines Gp 120 et Gp 41. On retrouve ces 3 protéines à la surface des cellules infectées par le HIV. De plus, la Gp 160 et la Gp 120 possèdent une affinité pour la molécule CD4 présente à la surface de certains lymphocytes T, molécule

CD4 qui sert de porte d'entrée du virus HIV vers l'intérieur de la cellule. Jusqu'à présent, très peu d'épitopes accessibles au système immunitaire ont été décrits sur l'enveloppe du virus HIV (Burton D.R , 1997 Proc.Natl. Acad. Sci. USA 94: 10018-10023).

5 Il existe donc un besoin dans la caractérisation de nouveaux épitopes de l'enveloppe du HIV.

Il existe aussi un besoin à identifier des épitopes de l'enveloppe qui soient inducteurs d'anticorps neutralisants, ou en d'autres termes qui soient capables de réduire
10 ou de supprimer la dissémination virale.

Il existe également un besoin d'identifier une composition pharmaceutique permettant de traiter efficacement ou de prévenir l'infection à virus HIV.

15 Enfin il existe aussi un besoin de développer des réactifs rentrant notamment dans la composition de kits immunologiques qui permettent de distinguer notamment parmi les personnes infectées celles qui sont le plus résistantes à l'infection ou "long-term non progressor" et de tester, par exemple l'efficacité de nouveaux vaccins par leur capacité à induire des anticorps neutralisants.

20

Résumé de l'invention

La présente invention vise à pallier ces besoins en identifiant de nouvelles structures peptidiques pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'infection à virus HIV
25 à partir de l'utilisation d'une banque combinatoire d'anticorps provenant de patients HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor". A cet effet, l'invention concerne toute structure peptidique capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de l'enveloppe du HIV provenant, par exemple, d'une banque combinatoire d'anticorps obtenu à partir de lymphocytes de patients HIV positif et appartenant au
30 groupe des "long term non progressor", comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel de l'enveloppe dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène.

La sélection de mimotopes au moyen d'anticorps recombinants provenant de
35 patients HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor" présente

l'avantage d'identifier de nouveaux épitopes inducteurs d'anticorps neutralisants qui soient efficaces dans la protection contre des isolats primaires de virus HIV

La présente invention concerne également tout vecteur recombinant
5 comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un polynucléotide codant pour un peptide répondant aux critères définis ci dessus.

La présente invention concerne aussi une composition thérapeutique ou prophylactique du virus HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe
10 actif comprend un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide.

Enfin la présente invention concerne aussi

- l'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus en tant que réactif
15 pour le diagnostic du virus HIV permettant notamment d'identifier les sujets en contact avec le virus plus résistants à l'infection, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.

- l'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou d'un vecteur
20 recombinant codant pour ledit peptide pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique destinée au traitement ou à la prévention de l'infection par le virus HIV.

25 Description de l'invention

Dans le contexte de la présente invention, différents termes employés sont ci-après définis:

30 "Par peptide" on entend une séquence d'au moins 6 acides aminés liés entre eux par une liaison peptidique obtenu par synthèse chimique ou par des techniques de recombinaison génétique, de préférence entre 6 et 100 acides aminés et notamment entre 20 et 80 acides aminés.

35 "Par antigène de l'enveloppe du HIV" on entend toute entité moléculaire qui se lie à

un anticorps spécifique de tout produit issu du gène env, comprenant notamment la gp 160 sous forme naturelle ou recombinante, ses dérivés constitués par la gp41 et la gp 120 pouvant également être sous forme naturelle ou recombinante et les produits issus de la combinaison desdites molécules.

5

"Par épitope conformationnel" on entend une structure tridimensionnelle qui permet son positionnement dans le site de liaison spécifique d'un anticorps, à la façon d'une clef dans une serrure, et qui est représentée par une séquence d'acides aminés qui ne correspond pas à une séquence continue en acides aminées de la protéine contre laquelle est dirigé cet anticorps. De préférence, cette séquence en acides aminés de l'épitope conformationnel n'est pas homologue à une séquence continue en acides aminés de la protéine naturelle ou recombinante, l'homologie étant définie par la combinaison de deux critères:

10

- le critère d'identité des acides aminés déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont identiques à ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle ou recombinante, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité en acides aminés ne dépassera pas de préférence 50%, voire 60% ou 70% ou 80% ou même 90%.

15

- Le critère d'enchaînement déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont à la fois identiques et se trouvent à la même position d'enchaînement que ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle ou recombinante, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité d'enchaînement ne dépassera pas 70 à 80%.

20

25

" Par long term non progressor" on entend des sujets HIV positifs caractérisés sur le plan clinique, en ce qu'ils ne développent de SIDA depuis qu'ils sont contaminés avec un recul d'au moins dix années, sur le plan biologique, en ce qu'ils ne montrent pas de signes d'immunosuppression avec notamment un taux de lymphocytes T CD4 supérieurs à 600/mm³ et enfin ne recevant pas de traitement antiviral particulier.

30

"Par mimotope" on entend un épitope qui mime la structure tridimensionnelle d'un autre épitope en se fixant sur le site de liaison spécifique du même anticorps

35

"Par CDR3" on entend la région hypervariable d'enchaînement en acides aminés de

la chaîne lourde et légère des immunoglobulines et qui se situe au niveau du site d'interaction spécifique avec l'épitope.

5 "Par conjugué" on entend l'association du peptide tel que défini dans l'invention à toute autre molécule, par des procédés physiques ou chimiques, ayant pour vocation d'induire ou de renforcer l'immunogénicité du peptide de départ.

10 "Par immunogénicité" on entend la capacité d'une entité moléculaire, après inoculation à un mammifère, à induire une production d'anticorps spécifiquement dirigé contre cette entité.

15 "Par polynucléotide" on entend soit une séquence d'ARN, soit une séquence d'ADN, soit une séquence d'ADNc résultant de la transcription inverse d'une séquence d'origine naturelle ou de synthèse, avec ou sans bases modifiées.

"Par voie muqueuse", on entend un mode d'administration qui met en contact directement la composition pharmaceutique avec les différents types de muqueuses de l'organisme.

20 "Par voie parentérale", on entend un mode d'administration qui met directement en contact la composition pharmaceutique avec les tissus ou organes interne de l'organisme.

25 L'invention vise donc tout peptide qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de l'enveloppe du HIV et qui est reconnu par un anticorps obtenu à partir d'un patient "long term non progressor" et spécifique de cet antigène. Un peptide selon l'invention peut être représenté avantageusement par l'une des 11 séquences telle que suit

30	SEQ ID NO : 1	Phe Asn Leu Thr His Phe Leu
	SEQ ID NO : 2	Glu Gly Trp His Ala His Thr
	SEQ ID NO : 3	Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr
	SEQ ID NO : 4	Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr
	SEQ ID NO : 5	Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe
	SEQ ID NO : 6	Asp Ser His Thr Pro Gln Arg
35	SEQ ID NO : 7	Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe

SEQ ID NO : 8 His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met
SEQ ID NO : 9 Ala Trp His Glu Ser Arg Ala
SEQ ID NO : 10 Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr
SEQ ID NO : 11 Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala

5

10

15

20

A partir d'une banque combinatoire d'anticorps obtenue notamment à partir du sang périphérique d'un sujet ayant été infecté par le virus HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors", caractérisé en ce que ledit sujet appartenant à ce groupe est asymptomatique sur le plan clinique depuis au moins 10 ans et ne montre pas de signes biologiques d'immunosuppression avec notamment un taux de lymphocytes T CD4 supérieur à $600/\text{mm}^3$, et d'une librairie synthétique de peptides, on peut identifier, par le biais de mimotopes, de nouveaux épitopes conformationnels présents sur l'enveloppe du HIV, notamment des épitopes qui peuvent se situer en dehors de la boucle V3, comme par exemple des épitopes se situant dans la région du site de liaison au récepteur CD4, des épitopes chevauchant la boucle V2 et le site de liaison au récepteur CD4 ou même des épitopes chevauchant les régions C2, C3 et V4 de la Gp120 ou des épitopes se situant dans les régions non immunodominantes de la Gp 41 (clusters I et II). L'identification de ces mimotopes nécessite pour leur mise en œuvre un processus technologique sophistiqué, à savoir:

25

-la constitution d'une librairie combinatoire d'anticorps suffisamment complexe pour refléter au mieux le répertoire naturel en anticorps d'un individu, et de façon avantageuse le répertoire en anticorps d'un individu infecté par le HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors";

30

35

-la sélection au sein de cette banque, d'anticorps recombinants spécifiques d'antigènes de l'enveloppe du HIV, notamment exprimés par la Gp160, la Gp120, la Gp41 pouvant être sous forme de protéines naturelles ou recombinantes, glycosylées ou déglycosylées, monomériques ou multimériques ou enfin combinées entre elles ou non. La sélection des anticorps recombinants spécifiques comprend de façon préférentielle une étape supplémentaire consistant en la mesure de l'activité neutralisante de ces anticorps recombinants vis à vis de l'infection virale médiée notamment par un ou plusieurs isolats primaires du virus HIV. On retiendra de façon préférentielle les anticorps recombinants spécifiques et neutralisants de

plusieurs isolats primaires du virus HIV.

-la sélection de peptides spécifiques des anticorps recombinants, à partir d'une
bibliothèque synthétique aléatoire de peptides obtenue par recombinaison moléculaire, la
dite sélection pouvant se faire par ELISA ;

-la caractérisation de ces peptides comme étant des mimotopes d'épitopes
conformationnels du HIV en ce qu'il n'y a pas de correspondance entre la séquence
en acides aminés dudit peptide avec une quelconque séquence continue en acides
aminés retrouvée dans les protéines de l'enveloppe du HIV d'une part et d'autre
part en ce que ce peptide est capable d'inhiber l'interaction de l'anticorps
recombinant avec le produit du gène env qui a servi à la sélection dudit anticorps
recombinant.

On peut également procéder à la transformation des lymphocytes provenant
d'un patient "long term non progressor" en utilisant, par exemple le virus d'Epstein
Barr (EBV) pour la sélection de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques de
l'enveloppe du HIV. Le procédé de transformation lymphocytaire est bien connu de
l'homme de métier et aboutit, après plusieurs cycles de sélection contre l'antigène
d'intérêt à l'obtention des clones lymphocytaires transformés et immortels, chaque
clone produisant un seul type d'anticorps monoclonal. Ces anticorps monoclonaux,
comme les anticorps recombinants issus de la banque combinatoire peuvent être
également testés pour leur activité neutralisante contre différents isolats primaires
du HIV avant d'être utilisés pour la sélection de peptides mimotopes de l'enveloppe
du HIV.

Pour induire ou plutôt renforcer l'immunogénicité du peptide mimant un
épitope conformationnel du HIV, la présente invention a également pour objet des
peptides comprenant une répétition (2 ou plus) du peptide conforme à l'invention.
Notamment, l'accouplement des deux peptides identiques peut se faire au besoin
par le biais d'un bras espaceur intercalaire constituée par l'enchaînement en acides
aminés Gly Pro Gly.

L'invention concerne également une combinaison de différents peptides
conformes à l'invention, ainsi qu'à des peptides comprenant à la fois des répétitions
et des combinaisons.

Dans de tels cas, les peptides peuvent être joints par des liaisons covalentes ou des liaisons non covalentes. Par exemple, on peut citer avantageusement la méthode développée par Posnett et al (J. Biol. Chem. (1988) 263: 1719) qui n'altère pas la structure tridimensionnelle de l'épitope ou des épitopes porté par le peptide et aboutit à la formation de multimères du même peptide ou de peptides différents.

Dans le cadre notamment des préparations antigéniques et des formulations vaccinales qui sont décrites ci-après, on peut aussi préférer conjuguer par liaison covalente les peptides de l'invention à des molécules immunogènes usuellement utilisées pour rendre immunogène les peptides de petite taille.

Les peptides selon l'invention peuvent ainsi être conjugués aux protéines immunogènes connues telles que les sérum albumines, thyroglobuline, ovalbulmine, gélatine, haemocyanine (e.g. Keyhole Limpet Haemocyanin KLH), séroglobulines, anatoxine tétanique, anatoxine diphtérique, protéines de membranes externes de bactéries, etc, mais on peut aussi préférer conjuguer les peptides à des épitopes "T helper" parmi lesquels on choisit notamment les épitopes "T helper" du HIV , par exemple les épitopes T1 et p24E tels que décrits dans WO 94/29339 (Connaught). Les réactions de conjugaison avec lesdits épitopes "T helper" du HIV nous permettent d'obtenir des composés dont l'enchaînement séquentiel est p24E-GPG-X-GPG-T1 où:

-p24E symbolise la séquence d' acides aminés de l'épitope p24E, ladite séquence étant placée du côté N terminale du peptide selon l'invention;

-GPG symbolise l'enchaînement glycine-proline-glycine;

-X symbolise le peptide d'intérêt selon l'invention qui peut-être au besoin le produit de la combinaison de plusieurs séquences d'acides aminés identiques ou différentes conformes à l'invention;

-T1 symbolise la séquence d'acides aminés de l'épitope T1, ladite séquence étant placée du côté C terminale du peptide selon l'invention;

Parmi ces composés on peut citer les composés comprenant les séquences 12 à 14

SEQ ID NO : 12 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe

Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly
Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
Lys Ala Met Tyr Ala

5

SEQ ID NO : 13

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe
Thr Gly Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr Gly
Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
Lys Ala Met Tyr Ala

10

SEQ ID NO : 14

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg
Phe Tyr Lys Gly Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe
Leu Gly Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe Leu Gly
Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Glu
Lys Ala Met Tyr Ala

15

Ces conjugués peuvent eux-mêmes être greffés sur une ossature ramifiée de lysine de façon à obtenir des polymères desdits conjugués sous une forme ramifiée telle que décrite dans WO 94/29339 (Connaught) le contenu technique dudit brevet étant incorporé par référence dans l'objet de l'invention.

20

Les techniques de conjugaison sont aussi parfaitement connues de l'homme de l'art. On peut recourir par exemple aux agents hétérobifonctionnels tels que SPDP, carbodiimide, glutaraldéhyde, système biotine/avidine, etc.

25

On peut aussi coupler les peptides à des lipopolysaccharides, polysaccharides, glycopeptides, analogues du muramyl peptide, acides gras, etc. De préférence, on effectue le couplage d'un peptide avec un acide gras du type palmitoyl-lysine tel que décrit dans EP 491628 (Biovector) ou (Pam)3 Cys-Ser tel que décrit dans EP547681 (Merck), par exemple, le contenu technique desdits brevets étant incorporé par référence dans l'objet de l'invention.

30

35

Les méthodes pour lier de manière opérationnelle des peptides

individuels par des chaînes latérales portant des résidus d'acide aminé, afin de former un conjugué immunogène, par exemple un polymère polypeptidique ramifié, sont aussi bien connues de l'homme de l'art. Par ces méthodes, on cherche à établir des liaisons sur différentes chaînes latérales par un ou plusieurs types de groupes fonctionnels afin d'obtenir une structure dans laquelle les structures peptidiques sont liées par covalence tout en étant séparées par au moins une chaîne latérale. Comme groupes fonctionnels, on peut citer les groupes aminés epsilon, les groupes bêta- ou gamma-carboxyliques, les groupes thiol (-SH) et les cycles aromatiques (par exemple tyrosine et histidine). Des méthodes pour lier des polypeptides à l'aide de ces groupes fonctionnels sont décrits dans Erlanger (1980 Method of Enzymology, 70 : 85), Aurameas et al., (1978 Scand. J. Immunol., Vol.8, suppl. 7, 7-23) et US-A-4 193 795. En outre, il est également possible de mettre en oeuvre une réaction de couplage dirigée telle que décrite dans Rodwell et al., (1985 Biotech 3, 889-894). Les peptides peuvent également être modifiés pour incorporer des bras d'espacement tels que hexaméthylène diamine ou d'autres molécules bi-fonctionnelles de tailles similaires.

Les peptides peuvent être également formulés avec de l'alum, du monophosphoryl Lipid A, pluronics, SAF1, Ribi, trehalose-6,6-dimycolate ou autres composés immunostimulants connus de l'homme de l'art pour accroître l'immunogénicité du peptide auquel ces composés sont liés.

Néanmoins toutes ces méthodes de conjugaison, de modification, de répétition ou de combinaison de peptides conformes à l'invention doivent respecter au mieux la conformation originelle du peptide.

La présente invention a aussi pour objet les fragments d'ADN codant pour les peptides selon l'invention et pouvant être utilisés pour produire les peptides par expression de la séquence d'ADN dans un système d'expression approprié. En tenant compte de la dégénérescence du code, l'homme de l'art est parfaitement à même de déterminer les différentes séquences d'ADN aptes à coder pour les différents peptides conformes à l'invention.

Selon un premier aspect de l'invention, le système d'expression est un système d'expression in vitro pour la production des peptides en vue de leur utilisation ultérieure, e.g. comme réactif de diagnostic, comme composant antigénique ou comme composant vaccinal. De tels systèmes ou vecteurs d'expression in vitro sont parfaitement connus de l'homme du métier et l'on peut citer à titre d'exemple les bactéries telles que *E. coli*, les cellules eucaryotes telles que les levures, notamment *S. cerevisiae*, le baculovirus, notamment propagé sur cellules d'insectes, etc.

L'invention a donc aussi pour objet une cassette d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et des séquences régulatrices permettant l'expression de ce fragment d'ADN dans un système d'expression in vitro approprié.

Selon un deuxième aspect de l'invention le système d'expression est un système d'expression in vivo pour générer chez le patient traité une réaction immunitaire, de préférence protectrice. En d'autres termes, le système d'expression, qui peut être répliatif ou non répliatif, va exprimer le peptide in vivo. L'homme du métier a à sa disposition de tels systèmes. A titre d'exemples préférés, on peut citer les plasmides, notamment plasmides nus, e.g. selon WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660, les poxvirus, tels que le virus de la vaccine et les pox aviaires (fowlpox, pigeonpox, canarypox, etc.), les adénovirus, etc.

L'invention a donc aussi pour objet des cassettes d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et les moyens de régulation de l'expression dans le système d'expression choisi. Elle a aussi pour objet le système d'expression ou vecteur d'expression, comprenant une telle cassette d'expression, en particulier plasmide, poxvirus, adénovirus, comme vu ci-dessus.

L'invention enfin a pour objet l'utilisation des phages exprimant le peptide d'intérêt ou une combinaison de phages exprimant les peptides d'intérêt comme réactif de diagnostic, comme composant antigénique ou

vaccinal.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'au moins un peptide conforme à l'invention en association ou non avec au moins un vecteur recombinant conforme à l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à guérir d'une affection liée au virus HIV. Une composition selon l'invention peut comprendre des préparations pouvant être sous forme de crèmes, de poudres lyophilisées ou non, de solutions, de suspensions, pour des administrations par voie muqueuse telle que oral, nasal, rectal, génital, cutanée, par exemple. Pour des administrations parentérales telle que intra dermique, sous cutanée, intra musculaire, intra veineuse, intra artériel, intra lymphatique ou intra péritonéale, par exemple, les préparations injectables stériles pourront être selon les cas sous forme de solutions, de suspensions ou d'émulsions. Outre le ou les principes actifs, conforme à l'objet de l'invention, les préparations pourront contenir des excipients et/ou des agents stabilisants adaptés au mode d'administration.

Les préparations destinées à un usage vaccinal pourront également contenir des adjuvants ou être incorporées dans des systèmes de délivrance compatibles avec un usage en médecine humaine. On peut rapporter notamment l'usage des adjuvants comme l'Alum (phosphate d'aluminium phosphate ou hydroxyde d'aluminium ou le mélange des deux) incorporé de façon classique dans les vaccins, l'adjuvant incomplet de Freund, le lipide A monophosphorylé (MPL), QS21, Polyphosphazène, muramyl dipeptide (MDP) ou ses dérivés, l'usage de système de délivrance de l'antigène comme les émulsions (MF59, SAF1, RIBI, SB 62, SB 26), les ISCOMS, les liposomes, les microsphères composées de polymères de PLGA de diamètre bien calibré, ou éventuellement les pseudo virions.

Les doses et voies d'administration de ces compositions pharmaceutiques seront déterminées en prenant en compte la nature de la composition, le niveau d'expression du peptide d'intérêt par le vecteur recombinant s'il est inclus dans la préparation, de l'âge, du sexe et du poids de l'individu recevant la préparation. Il sera également tenu compte de l'importance relative de la molécule porteuse dans le conjugué s'il est inclus

dans la composition .

Compte tenu de tous ces facteurs qui sont connus et appréciés par l'homme du métier, les doses de peptides administrées pourront atteindre 1 à 5 mg mais plus généralement se situeront entre 5µg et 1 mg par injection, de préférence 50 à 500µg. Le vecteur recombinant codant pour le peptide d'intérêt pourra être administré ou utilisé pour transfecter ou infecter les cellules d'intérêt à une dose minimale de $10^{3.5}$ unités infectantes (pfu ou plaque forming unit). De façon préférentielle, le vecteur recombinant sera utilisé dans une échelle de dose allant de 10^4 à 10^{10} pfu en fonction de l'efficacité d'expression du peptide par ce vecteur et notamment dans une échelle de dose allant de 10^6 à 10^9 pfu, par exemple. Lorsque la composition pharmaceutique comprend plusieurs vecteurs recombinants codant pour des peptides d'intérêt différents, il est bien entendu que ces mêmes échelles de doses pourront être appliquées à ces combinaisons. L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques utilisant des préparations à base de vecteurs recombinants, notamment les pox virus recombinants, les adenovirus recombinants, déjà réalisés chez l'homme pour convenir du nombre approprié de pfu que doit renfermer la composition pharmaceutique.

Lorsque la composition pharmaceutique comprend un plasmide contenant le système d'expression du peptide d'intérêt, il sera pris en compte dans le dosage de cette composition le niveau de réponse immune que cette composition est capable d'induire qui doit être au moins égale à celle du peptide intact ou modifié et/ou du niveau d'expression du peptide induit par le plasmide dans les cellules de l'organisme qui doit approcher le plus possible celui obtenu par les vecteurs recombinants déjà cités. Par exemple, les quantités de plasmides contenus dans les compositions pharmaceutiques pourront se situer dans des échelles allant de 1µg à 100mg, de façon préférentielle entre 0,1mg à 10mg . L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques déjà réalisés chez l'homme, utilisant des préparations d'ADN plasmidique pour convenir de la dose de plasmide que doit renfermer la composition pharmaceutique.

Pour la prévention de l'infection à HIV, la composition pharmaceutique pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises pour atteindre le niveau de réponse désirée comprenant notamment le niveau et la qualité de la réponse anticorps spécifique et/ou à médiation cellulaire spécifique désirée, et caractérisée en ce qu'elle garantie la protection de l'individu vis à vis d'une contamination accidentelle. Pour atteindre cet objectif il pourra être nécessaire, outre la composition de la préparation, la voie d'administration choisie, de respecter les délais impartis entre chaque injection, qui peuvent être de façon préférentielle de 1 mois, 2 mois ou 6 mois et/ou de faire usage de façon combinée ou alternée pendant la durée du protocole médical, notamment vaccinal, de compositions pharmaceutiques différentes se rapportant au peptide, au vecteur recombinant, au plasmide d'intérêt ou même aux phages exprimant le ou les peptides d'intérêt que l'homme de l'art est capable de maîtriser. Il pourra être également nécessaire pour maintenir le niveau de protection de pratiquer des injections de rappel à intervalles réguliers.

Pour le traitement de l'infection liée au HIV, la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises et de façon pouvant être très rapprochées, notamment dans des délais inférieurs à une semaine, pour atteindre le niveau de réponse désirée, notamment celui qui permet de constater l'absence du virus HIV dans le sang par le test PCR. Au besoin, la composition pharmaceutique comprenant le peptide, le vecteur, le plasmide d'intérêt ou même aux phages exprimant le ou les peptides d'intérêt pourra être associé ou utilisé en alternance avec les traitements conventionnels de cette affection, comprenant notamment les mono, bi ou tri thérapie antivirale.

Que ce soit pour la prévention ou le traitement de l'infection à HIV il pourra être également utile de recourir à une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs peptides d'intérêt, le ou les vecteurs recombinants d'intérêt correspondants ainsi que le ou les plasmides d'intérêt ou même les bactériophages exprimant le ou les peptides d'intérêt pour stimuler les cellules du système immunitaire du patient in vitro ou ex vivo et

de les ré-injecter ensuite dans l'organisme de l'individu. Cette méthodologie a notamment été développée dans le traitement immunothérapeutique du cancer.

5 L'invention a pour objet enfin l'utilisation des peptides d'intérêt en tant que réactif pour le diagnostic de l'infection à HIV permettant notamment d'identifier les sujets plus résistants à l'infection encore appelés "Long term non progressor" ou à l'inverse d'identifier les sujets infectés plus susceptibles de développer un SIDA rapidement.. Pour la première fois des
10 nouveaux épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV ont été définis. On peut donc utiliser ces peptides, à des fins diagnostiques, pour rechercher préférentiellement des anticorps neutralisants d'isolats primaires du HIV, qui, très souvent reconnaissent des épitopes conformationnels et permettre ainsi de distinguer les individus "Long term non progressor" (
15 possédant des anticorps neutralisants) de ceux qui sont susceptibles d'évoluer rapidement vers un SIDA si aucun traitement, notamment anti-viral, n'est mis en place rapidement (ne possédant pas d'anticorps neutralisants).

La présente invention a donc aussi pour objet une méthode de
20 diagnostique de l'infection à HIV et/ou de susceptibilité des sujets infectés à développer un SIDA rapidement, la dite méthode étant basée préférentiellement sur l'analyse de la réponse humorale. Pour l'analyse de la réponse humorale on pourra utilisée des méthodes immunoenzymatiques, radioimmunologiques, ou de western blotting bien connues de l'homme du
25 métier, comme par exemple les méthodes ELISA, RIA, RIPA ou IRMA.

Description des figures

Les figures 1 à 5 représentent, en fonction de leur dilution, les courbes de
30 fixation des phages exprimant respectivement les séquences peptidiques SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 à un anticorps recombinant spécifique de la Ggp 160 et issu de la librairie combinatoire d'anticorps fabriqué à partir de lymphocytes d'un sujet "long term non progressor" (■) et à un anticorps IgG non spécifique d'antigène d'enveloppe du HIV (●), ces deux anticorps
35 étant préalablement fixés sur des plaques ELISA. L'intensité de la fixation est

proportionnelle à la valeur de la densité optique (D.O.) obtenue par ELISA.

La présente invention est décrite plus en détail ci après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de sélection d'anticorps dirigés contre l'enveloppe du HIV, de sélection de peptides selon l'invention, de synthèse de peptides selon l'invention, d'induction d'anticorps spécifiques de peptides selon l'invention, de compositions vaccinales selon l'invention et d'utilisation de peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à HIV. Il va de soi, toutefois que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune matière une limitation.

Exemple 1: Sélection de peptides

La fabrication d'anticorps recombinants utilisant des méthodes de biologie moléculaire se sont largement développées depuis les dix dernières années et sont maintenant bien connues de l'homme du métier. Il est aussi connu que la spécificité d'un anticorps recombinant est portée essentiellement par les CDR3 des chaînes légères et lourdes. La connaissance de l'enchaînement en acides aminés qui représente le CDR3 et de la structure du squelette des chaînes lourdes et légères d'un anticorps donné est suffisante pour que l'homme de métier puisse reproduire et reconstituer un anticorps recombinant équivalent ayant les mêmes caractéristiques de reconnaissance dudit anticorps.

Les séquences codant pour les parties de chaînes lourdes et légère des molécules Fab sélectionnées peuvent être isolées et synthétisées, et clonées dans tout vecteur ou réplicon permettant leur expression.

Tout système d'expression approprié peut être utilisé, par exemple bactéries, levures, cellules d'insecte, d'amphibien et de mammifère. Les systèmes d'expression dans la bactérie incluent ceux décrits dans Chang et al. (1978) Nature 275 : 615, Goeddel et al. (1979) Nature 281 : 544, Goeddel et al. (1980) Nucleic Acids Res. 8 : 4057, EP-A-36,776, US-A-4,551,433, deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 21-25, and Siebenlist et al. (1980) Cell 20 : 269. Les système d'expression dans les levures incluent ceux décrit dans Hinnen et al. (1978) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 75 : 1929, Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153 : 163, Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6 : 142, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132 : 3459, Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202 : 302, Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158 : 1165, De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154 : 737, Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8 : 135, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5 : 3376, US-A- 4,837,148 et 4,929,555, Beach et al. (1981) Nature 300 : 706, Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 380, Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 49, Ballance et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112 : 284-289, Tilburn et al. (1983) Gene 26 : 205-221, Yelton et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1470-1474, Kelly et al. (1985) EMBO J. 4 : 475479 ; EP-A-244,234 et WO-A-91/00357.. L'expression de gènes hétérologues dans les insectes peut être réalisée comme décrit dans US-A-4,745,051, EP-A-127,839 et EP-A-155,476, Vlak et al. (1988) J. Gen. Virol. 69 : 765-776, Miller et al. (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42 : 177, Carbonell et al. (1988) Gene 73 : 409, Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594, Lebacqz-Verheyden et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8 : 3129, Smith et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8404, Miyajima et al. (1987) Gene 58 : 273, et Martin et al. (1988) DNA 7 : 99.. De nombreux souches et variants de baculovirus et cellules d'insectes permissives sont décrits dans Luckow et al. (1988) Bio/Technology 6 : 47-55, Miller et al. (1986) GENERIC ENGINEERING , Setlow, J.K. et al. Eds. Vol. 8, Plenum Publishing, pp. 277-279, and Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594.. L'expression en cellules de mammifère peut être réalisée comme décrit dans Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4 : 761, Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6777, Boshart et al. (1985) Cell 41 : 521, et US-A-4,399,216. On peut aussi se reporter à Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58 : 44, Barnes et al. (1980) Anal. Biochem. 102 : 255, US-A-4,767,704, 4,657,866 ; 4,927,762 ; 4,560,655 ; brevet US RE 30,985, WO-A-90/103430 et WO-A-87/00195.

Les lymphocytes du sang périphérique provenant d'un sujet ayant été infecté par le virus HIV et appartenant au groupe des "long-term non progressors", sont utilisés pour produire la librairie combinatoire d'anticorps. L'ADNc des lymphocytes est obtenu à partir de l'ARN en utilisant une méthodologie développée par Sodoyer R. et al. (1997) Human Antibodies 8: 37. La librairie de chaînes lourdes et légères est construite en utilisant les phagemides pVH (pM

831) et pVL (pM452). Les deux bibliothèques sont ensuite associées de façon "Random" par sous clonage des gènes VL dans la bibliothèque de chaînes lourdes. La bibliothèque de phagemides obtenue est ensuite infectée par le phage helper M13 VCS permettant ainsi l'expression des Fab à la surface des phages. Après
5 sélection des phages exprimant les Fab à leur surface par "panning" contre la protéine Gp 160, on détermine la séquence nucléotidique des Fab recombinants exprimés par les isolats positifs et notamment les séquences CDR3 portées par les fragments de chaînes lourdes et légères.

10 Un des anticorps recombinants spécifiques de la Gp 160 provenant de cette banque combinatoire est ensuite utilisé pour sélectionner les séquences peptidiques SEQ NO:1 à SEQ NO:11 à partir d'une banque de phages commercialement disponible exprimant des peptides de façon random (pHD7, NEB) en opérant de la façon suivante:

15 1,4 10^{11} phages sont incubés avec 30 ou 300ng de l'anticorps recombinant selon l'exemple 1 dans 200 μ l de PBS-0,1% tween 20 pendant 20 min à 20°C. Le mélange est transféré dans un tube contenant 50 μ l de protéine G couplée à des billes de sépharose préalablement équilibrées pendant 1 heure dans 1 ml de PBS-0,1% tween 20 contenant 5% de lait écrémé. Après une nouvelle incubation de 20
20 min, les billes sont centrifugées et lavées 3 fois par 1ml de PBS-0,1% tween 20. Au 4^{ème} lavage, les billes sont reprises par du PBS-0,1% tween 20 contenant 5% de lait écrémé, incubées 10 min, centrifugées et rincées à nouveau 3 fois par du PBS-0,1% tween 20. Après la dernière centrifugation les billes sont reprises dans 1 ml de glycine-HCl 0,2 M, pH=2,2, incubées 10min à 20°C et centrifugées. Le surnageant
25 est transféré dans un tube contenant 60 μ l de Tris base 2M pH=7,5, de façon à neutraliser la solution puis incubé avec 2 ml de bactéries E. Coli 7118 en phase exponentielle de croissance pendant 15 min. Le volume de la culture a été complété à 100 ml avec du milieu LB, et l'incubation a été poursuivie 4h à 37°C. Après une centrifugation destinée à éliminer les bactéries, les phages sont
30 précipités par addition de 25 ml de PEG 20%-NaCl 2,5M dans le surnageant de culture pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation (10 000 rpm, 20 mn, 4°C) le culot de phages est repris dans 1 ml de PBS-0,1% tween 20-1% lait écrémé, et titré. Le criblage est complet lorsque l'ensemble du processus a été répété 3 à 4 fois.

Pour compléter la sélection des phages exprimant les séquences peptidiques 1 à 11 on les a également testés par ELISA comme suit:

0,2 mg d'anticorps recombinant spécifique de la Gp 160 ou d'anticorps qui n'a pas de spécificité pour un antigène de l'enveloppe du HIV nommé "témoin Ig", dilués dans 50 µl de PBS, est déposé dans chaque puits d'une plaque ELISA suivi d'une incubation pendant 1 nuit à 4°C. Après remplacement de la solution d'anticorps par 0,1 ml de PBS-0.1% tween 20 (PBST) contenant 5 % de lait écrémé et incubation pendant 1h à 37°C, et réalisation d'une gamme de dilution de raison 2 sur les phages exprimant les séquences peptidiques, SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 en PBST-1% lait écrémé, les différentes dilutions réalisées sont distribués dans les puits sensibilisés soit par l'anticorps recombinant spécifique selon l'exemple 1, soit par le témoin Ig. Au bout de 2 h à 37°C, les phages sont retirés par aspiration des dilutions puis les puits lavés 10 fois avec 0,2 ml de PBST. Les puits sont ensuite incubés 1h à 37°C avec une solution au 1 :1000 en PBST-1% lait d'un anticorps biotinylé dirigé contre le phage fd (SIGMA). Après une nouvelle série de lavages en PBST-1% lait, un complexe streptavidine-peroxydase (SIGMA) dilué au 1 :2000 en PBST est ajouté dans chaque puits suivi par une incubation d' 1 h à température ambiante et de lavages en PBST-1% lait. L'activité enzymatique de la peroxydase est révélée, classiquement, par addition d'une solution d'OPD diluée à 1mg/ml en tampon citrate de sodium. L'intensité de coloration de la solution d'OPD est ensuite mesurée au spectrophotomètre, puis les courbes de D.O. (densité optique) sont établis en fonction de la dilution de phages. Les courbes des figures 1 à 5 montrent, à titre d'exemple, que les phages exprimant les séquences peptidiques, SEQ ID NO: 7 à SEQ ID NO: 11 se fixent bien sur l'anticorps recombinant spécifique (D.O. $\geq 0,6$ observée pour au moins une dilution de phages) tandis qu'il n'y a pas de fixation significative sur le témoin Ig (D.O. $\leq 0,3$ quelque soit la dilution de phages testée dans la gamme de dilution allant de $5 \cdot 10^{11}$ phages/puits à $4,8 \cdot 10^8$ phages/puits). Les phages positifs, c'est à dire ceux qui se fixent spécifiquement à l'anticorps recombinant spécifique sont amplifiés dans E. Coli . Des mini préparations d'ADN phagiques sont réalisées selon les procédures décrites dans les ouvrages de Maniatis , l'ADN est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique à partir duquel on en déduit la séquence du peptide exprimé par le phage.

Exemple 2: Synthèse de peptides

Les peptides des SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11, sont synthétisés en phase solide en se référant aux méthodologies développées dans les ouvrages Solid phase peptide synthesis: a practical approach, IRL Press, Oxford, 1989 et Solid phase peptide synthesis, second edition, publié par Pierce Chemical Company, 1984.

La fonction α aminée des acides aminés est protégée par introduction d'un groupement t-butyloxycarbonyl (t-boc) permettant ainsi un accouplement par la fonction carboxylique de l'acide aminé à une résine chlorométhylée active. Après fixation sur la résine, la fonction amine est "déprotégée" par action de l'acide trifluoroacétique suivi d'une étape de neutralisation par la triéthylamine. La fonction amine ainsi libérée subit ensuite une réaction d'accouplement avec un autre acide aminé sous forme de dérivé t-boc par l'intermédiaire de carbodiimides. Ce procédé est mis en œuvre par l'automate ABI (Applied Biosystem Inc) 430A qui réalise ainsi la synthèse automatique de peptides. A la fin de la synthèse, le peptide est décroché de la résine par action de l'acide fluorhydrique. L'extrait est ensuite purifié par HPLC en phase inverse en utilisant une colonne semi préparative de type Vydac C4 et un gradient d'acétonitrile allant de 15 à 55% dans une solution d'acide trifluoroacétique à 0,1%. La chromatographie liquide est programmée pour une période de 40 min avec un débit de 2 ml/min. Le taux de pureté des peptides est contrôlé par chromatographie analytique et dépasse 95%.

Exemple 3: Induction d'anticorps spécifiques

1) Induction d'anticorps chez les cobayes et lapins

Les peptides des SEQ ID NO : 1 à 6, présentés sur des phages sont injectés à des cobayes et lapins : 2 injections de 100 microlitres par voie intraveineuse, à 3 semaines d'intervalle suivie d'une saignée finale 15 jours après la 2^{ème} injection. Les sérums sont testés en ELISA contre la gp160 et l'on observe une réaction contre la glycoprotéine. Ces peptides sont donc susceptibles d'induire une réponse contre la gp160.

2) Induction d'anticorps chez la souris

Les différents isolats de phages exprimant les peptides définis par les SEQ ID NO:7 à SEQ ID NO:11 sont purifiés sur gradient de chlorure de césium. On identifie ensuite 5 groupes de souris BaLB/c. Chaque groupe est immunisé par voie intrapéritonéale, 3 fois à 3 semaines d'intervalle avec un seul type d'isolat purifié exprimant soit la SEQ ID NO:7, soit la SEQ ID NO:8 soit la SEQ ID NO:9 soit la SEQ ID NO:10 soit la SEQ ID NO:11 à raison de 10^{12} phages purifiés par injection. Pour comparer les réponses anticorps, nous avons introduits 2 groupes de souris supplémentaires, le premier groupe recevant 3 injections de 10^{12} phages exprimant des peptides ne mimant pas d'épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV (phages irrelevantes), le deuxième recevant 3 injections de 5 µg de protéine Gp160. Nous avons aussi introduit un 8^{ème} groupe de souris qui a reçu un mélange d'isolats de phages, comprenant à parties égales des phages exprimant les SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 et SEQ ID NO:11. Quelques souris de ce groupe ainsi que quelques souris du groupe immunisé avec les phages irrelevantes ont reçu une 4^{ème} injection de 5 µg de Gp 160, 3 semaines après la 3^{ème} injection. L'analyse de la réponse anticorps spécifique est réalisée sur le sérum des souris de chaque groupe prélevés 15 jours après chaque injection. L'analyse de la réponse anticorps spécifique comprend la détection d'anticorps anti gp 160 par ELISA à l'aide de plaques sensibilisées avec la protéine Gp 160 en utilisant une procédure similaire à celle décrite dans l'exemple 1 et la recherche d'anticorps neutralisants. Pour la recherche d'anticorps neutralisants on détermine la dilution de sérum qui empêche la formation de syncytia dans 50% des micropuits infectés par 10 CCID₅₀ d'une souche de virus HIV. Après décomplémentation des sérums et réalisation d'une gamme de dilution de raison 2 en milieu RPMI, on mélange 500µl de la suspension de virus HIV titrant $10^{2.5}$ CCID₅₀/ml avec 500µl des différentes dilutions de sérums. Après une incubation de 2 heures à 37°C, le mélange est déposé sous un volume de 100µl sur des cellules CEMss préalablement fixées dans des micropuits (6 micropuits /dilution de serum). Après 1 heure de contact à 37°C avec les cellules CEMss, le mélange est aspiré et remplacé par du milieu de culture. Après 7 et 14 jours d'incubation, les cultures sont examinées au microscope pour le dénombrement des syncytia. Le titre neutralisant de 50% est déterminé selon la

méthode de Spearman et Kärber. On observe une bonne production d'anticorps chez les souris du 8^{ème} groupe qui a été immunisée avec le mélange d'isolats de phages exprimant les différentes séquences peptidiques (SEQ ID NO:7 à SEQ ID NO:11)

Exemple 4: formulations vaccinales

Un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 ou obtenu à partir du produit d'expression d'un vecteur recombinant et notamment d'un baculovirus recombinant en utilisant les techniques développées par Smith et al (USA 4,745,051). Des émulsions eau dans huile sont ensuite préparées en utilisant le squalène comme constituant de la phase organique, le tween 80 ou un mélange de tween 80 et de SPAN comme surfactant, la phase aqueuse contenant la solution de peptide. Lorsque l'hydrophobicité du peptide est très importante, on procède à la réalisation d'émulsions huile dans eau dans lesquelles le peptide sera associé à la phase organique. Au besoin des immunostimulants comme le QS 21, des dérivés du MPL, ou tout autre adjuvant sont incorporés dans la préparation de ces émulsions. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 5: Formulations vaccinales

On prépare une formulation vaccinale à base de liposomes comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 en se référant aux ouvrages tels que " Liposomes as Drug Carriers " édité par G. Gregoriadis, 1988, ou aux volumes 1 à 3 de "Liposome Technology édité par G. Gregoriadis, 1984. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 6: Formulations vaccinales

On prépare une formulation vaccinale à base d'ISCOMs contenant un peptide ayant

l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 en se référant à B Morein et al , 1984, Nature 308:457 ou B Morein et al Immunology toDay, 1987, 8(11):333.

5

Exemple 7: Formulations vaccinales

10

15

20

25

30

On prépare une formulation à base de micro particules comprenant un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 mimant un épitope conformationnel de l'enveloppe du HIV. Pour la préparation de micro particules ou de nanoparticules, de nombreux polymères synthétiques ou naturels sont utilisés comme le polymère de methyl métacrylate (Troster S.D. et al, 1992, J. Micro-encaps. 9:19) mais souvent le poly (d, l-lactide- co-glycolide) encore appelé PLGA est le référent du fait de sa biodégradabilité, de son innocuité et de ses applications déjà ancienne dans le domaine médical. Les micro particules de PLGA chargées en peptides sont préparées notamment par double émulsion eau dans huile dans eau. Le peptide est solubilisé en phase aqueuse puis émulsionné dans une solution de PLGA en phase organique comme le dichlorométhane. L'émulsion eau dans huile est obtenue par agitation à haute vitesse de la solution de peptide dans la solution organique de PLGA. Puis une seconde phase aqueuse contenant une concentration appropriée de surfactant tel que l'alcool polyvinylique est ajoutée à la première émulsion pour réaliser ainsi la double émulsion. D'autres surfactants sont également utilisés comme les sels biliaires ou le poly (oxyéthylène glycerol monoleate) pour stabiliser la double émulsion (Rafati H et al., 1997, Vaccine 15: 1888). Après agitation pendant une nuit pour permettre l'évaporation du solvant , les micro particules de PLGA sont lavées plusieurs fois dans l'eau distillée puis lyophilisée et gardées à 5°C. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 8: Composition vaccinale

35

Les peptides qui comportent moins de 20 acides aminés peuvent être faiblement immunogéniques . Pour augmenter l' immunogénicité des peptides ayant l'une des

séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par
synthèse chimique selon l'exemple 2, on prépare une formulation vaccinale à base
de polymères du même peptide ou de peptides différents, sous forme d'octamères
comprenant une structure poly-lysine ramifiée à 8 bras latéraux sur lesquels sont
5 fixés le même peptide ou des peptides différents selon l'exemple 1 en mettant en
œuvre le procédé développé par Posnett D.N et al. (1988) J. Biol. Chem. 263 :
1719. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale
destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 9: Composition vaccinale

On réalise une composition vaccinale comprenant un peptide ayant l'une des
séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4 décrites dans l'exemple 1
et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2, selon l'exemple 2 encadré par
les 2 épitopes T helper P24E et T du virus HIV, ces 2 épitopes jouant le rôle de
molécule porteuse et renforçant ainsi l'immunogénicité du peptide. La réaction
d'accouplement du peptide à ces 2 épitopes T helper se fait en 2 temps selon des
procédés classiques bien connus de l'homme de métier. Dans un premier temps on
réalise l'accouplement de la partie N terminale du peptide avec la partie C terminale
de la séquence peptidique représentant l'épitope p24E en intercalant un
25 espacement constitué de la séquence glycine- proline- glycine. Puis dans un
deuxième temps on réalise l'accouplement de la partie C terminale du produit
intermédiaire avec la partie N terminale de la séquence peptidique représentant
l'épitope T1 en intercalant la même séquence glycine- proline- glycine pour obtenir
le produit final. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition
30 vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 10: Composition vaccinale comprenant un lipopeptide

On prépare une formulation vaccinale comprenant un peptide ayant l'une des
séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par

synthèse chimique selon l'exemple 2 couplé à une ou plusieurs chaînes dérivés d'acides gras parmi lesquels la N_ε palmitoyl-lysine, la N,N-dipalmitoyl-lysine, le pimélaute, le trimexaute ou à un groupement stéroïdien parmi lesquels le N_ε[(cholest-5-ényl-3-oxy)-acétyl]-lysine ou l'acide (cholest-5-ényl-3-oxy) acétique selon le procédé décrit dans le brevet EP0491628 (INSERM) de façon à obtenir un lipopeptide. On utilise cette formulation pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 11: Expression des peptides par des poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour un peptide ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 mimant un épitope conformationnel de l'enveloppe du HIV. Les poxvirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue à partir de cellules embryonnaires de poulet infectées par les poxvirus et co-transfectées avec des plasmides contenant une cassette d'expression, flanquée aux extrémités de séquences d'ADN homologues à celles de régions non essentielles de l'ADN des poxvirus, et renfermant, sous la dépendance de promoteurs des poxvirus (H6, I3L), le poly nucléotide qui code pour le peptide selon l'exemple 2 en utilisant les procédés décrits dans les brevets US 4,769,330, 4,772,848, 4,603,112, 5,100,587, 5,179,993 et 5,863,542. On utilise ces poxvirus recombinants pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 12: Expression de plusieurs peptides par un poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 mimant plusieurs épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV. L'utilisation et la préparation de vecteurs recombinants codant pour plusieurs épitopes est bien connu de l'homme de métier (Toes RE et al.

(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14660, Thomson SA et al. (1996) J. Immunol. 157: 822) et est applicable aussi à la préparation de poxvirus recombinants codant pour des mimotopes multiples. On prépare notamment une composition vaccinale comprenant un canaripox recombinant (ALVAC recombinant) codant pour des mimotopes multiples de l'enveloppe du HIV. On utilise ces poxvirus recombinants pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 13: Combinaisons de peptides

On prépare une composition vaccinale comprenant plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 en utilisant les différents modes de préparation décrits dans les exemples 2 à 12 mimant plusieurs épitopes conformationnels de l'enveloppe du HIV. On utilise ces différentes compositions pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à la prévention ou au traitement de l'infection à virus HIV.

Exemple 13: Diagnostic

On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du HIV par ELISA en utilisant un ou plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 pour le diagnostic de l'infection à HIV à partir d'un échantillon biologique. De manière générale, on prélève un échantillon de fluide physiologique (sang, plasma, sérum), échantillon que l'on fait ensuite réagir en présence d'un peptide selon l'invention.

Pour ce faire, on utilise le peptide lui-même comme réactif de diagnostic. On recourt généralement

-soit à un test de diagnostic indirect, de type ELISA dans lequel le peptide fixé sur un support (puits) est mis en présence de l'échantillon à tester, tandis que la

révélation de la fixation antigène-anticorps est assurée par un anti-Ig marqué.
-soit à un test par compétition ou de déplacement, dans lequel on utilise un peptide selon l'invention, et un anticorps marqué spécifique du peptide. Le peptide est là aussi fixé à un support solide tel que puits, bandelettes. Dans le test de
5 compétition, on met le peptide simultanément en présence de l'échantillon (anticorps de l'échantillon) et d'un anticorps marqué spécifique du peptide. Les anticorps marqués à la peroxydase sont généralement utilisés.

Dans le test de compétition ou de déplacement on utilise généralement des anticorps monoclonaux et polyclonaux ou anticorps recombinants spécifiques du
10 peptide selon l'invention, qui sont parfois des fragments Fab ou F(ab)₂ et en particulier ceux décrits dans l'invention.

Exemple 14: Diagnostic

15 On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du HIV par immunochromatographie en utilisant un ou plusieurs peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à HIV à partir d'un échantillon biologique

Dans ce cas le peptide selon l'invention est fixé sur un support de type bandelette et on se réfère à l'article de Robert F.N Zurk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150
20 (1985) ainsi qu'aux brevets ou demandes de brevet WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 et US-A-5 238 652 pour mettre en œuvre le procédé.

25 Exemple 15 : Diagnostic

Etude de la réponse lymphoproliférative spécifique à un ou plusieurs peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'infection à virus HIV à partir d'un échantillon
30 biologique.

Le sang du patient est recueilli sur tube hépariné. Les lymphocytes sont ensuite séparés par centrifugation sur Ficoll hypaque puis distribués en microplaques 96 puits stériles à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits à fond rond sous un volume final de
35 200µl de milieu de culture complet (RPMI 1640 supplémenté par 25mM HEPES, 2mM L-glutamine, 50U/ml de pénicilline, 50µg/ml de streptomycine et 5% de sérum

AB décomplementé) et mis en présence de concentrations variables d'un ou plusieurs peptides ayant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:11 décrites dans l'exemple 1 et produit par synthèse chimique selon l'exemple 2 (concentrations allant de 1ng/ml à 50µg/ml). Chaque concentration de peptide est testé en triplicatte pour s'affranchir au mieux des variations biologiques. Des combinaisons multiples de peptides peuvent être également testés dans la gamme de concentration indiquée, par exemple une combinaison résultant de l'association d'un mimotope de l'enveloppe avec un mimotope de la nucléocapside dans la gamme de concentration indiquée. Après 5 jours de culture à 37 °c sous 5% CO₂, 0,5µci de thymidine tritiée est ajouté à chaque puits. Après une nouvelle incubation de 16 heures, on recueille l'ADN cellulaire de chaque puits de culture sur des filtres après précipitation à l'éthanol et on mesure le taux d'incorporation de thymidine tritiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide qui reflète l'intensité de la réponse lymphoproliférative. Les résultats sont exprimés sous la forme d'index de stimulation (moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire contenant une concentration donné en peptide/ moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire sans peptide). La réponse lymphoproliférative est considérée comme positive lorsque l'index de stimulation est supérieur à 3.

Revendications

- 1) Peptide pour la prévention ou le traitement thérapeutique de l'infection à virus HIV capable d'interagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de l'enveloppe dudit virus et provenant d'un patient HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor" , comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de ladite enveloppe sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène.
- 2) Peptide selon la revendication 1, selon laquelle l'antigène de l'enveloppe est représenté par la protéine d'enveloppe gp160.
- 3) Peptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ce peptide peut comprendre les séquences 1 à 11
- | | |
|----------------|---|
| SEQ ID NO : 1 | Phe Asn Leu Thr His Phe Leu |
| SEQ ID NO : 2 | Glu Gly Trp His Ala His Thr |
| SEQ ID NO : 3 | Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr |
| SEQ ID NO : 4 | Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr |
| SEQ ID NO : 5 | Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe |
| SEQ ID NO : 6 | Asp Ser His Thr Pro Gln Arg |
| SEQ ID NO : 7 | Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe |
| SEQ ID NO : 8 | His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met |
| SEQ ID NO : 9 | Ala Trp His Glu Ser Arg Ala |
| SEQ ID NO : 10 | Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr |
| SEQ ID NO : 11 | Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala |
- 4) Peptide comprenant l'enchaînement d'au moins deux peptides selon l'une des revendications 1 à 3.
- 5) Peptide selon la revendication 4 comprenant la duplication de peptides identiques.
- 6) Peptide selon la revendication 5 dans laquelle l'accouplement des deux peptides se fait au moyen d'un bras "espaceur" constitué de la séquence en acides aminés Gly Pro Gly

7) Conjugué comprenant au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 6 lié à une molécule porteuse pour induire ou renforcer l'immunogénicité dudit peptide.

5 8) Conjugué selon la revendication 7 selon laquelle la molécule porteuse comprend au moins un épitope T helper du virus HIV.

9) Conjugué selon la revendication 8 dont la molécule porteuse comprend l'épitope p24E et T1 du virus HIV

10

10) Conjugué selon la revendication 9, comprenant un peptide résultant de la duplication des séquences NO:1, NO:3 ou NO:4 selon la revendication 6, ledit peptide étant lié du coté N terminal à l'épitope p24E et du côté C terminal à l'épitope T1 par l'intermédiaire de 2 bras "espaceurs".

15

11) Conjugué selon la revendication 10, caractérisé en ce que les 2 bras espaceurs sont identiques et sont constitués de l'enchaînement Gly Pro Gly et qu'il comprend au choix l'une des séquences 12 à 14

SEQ ID NO : 12 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys

20

Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn
Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
Glu Lys Ala Met Tyr Ala

SEQ ID NO : 13 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly

25

Pro Gly Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Ser Thr Asn
Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
Glu Lys Ala Met Tyr Ala

SEQ ID NO : 14 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly

30

Pro Gly Phe Asn Leu Thr His Phe Leu Gly Pro Gly Phe Asn Leu
Thr His Phe Leu Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu
Val Glu Lys Ala Met Tyr Ala

12) Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un poly nucléotide codant pour un peptide selon l'une des revendications 1 à 11

5 13) Vecteur recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est un adénovirus, un poxvirus, un baculovirus, un bactériophage ou un plasmide.

10 14) Composition thérapeutique ou prophylactique pour l'infection à HIV, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide selon l'une des revendications 12 et 13.

15 15) Composition selon la revendication 14 dont le principe actif est sous la forme d'une formulation associée à un adjuvant compatible pour l'administration d'une dose efficace par voie muqueuse ou parentérale.

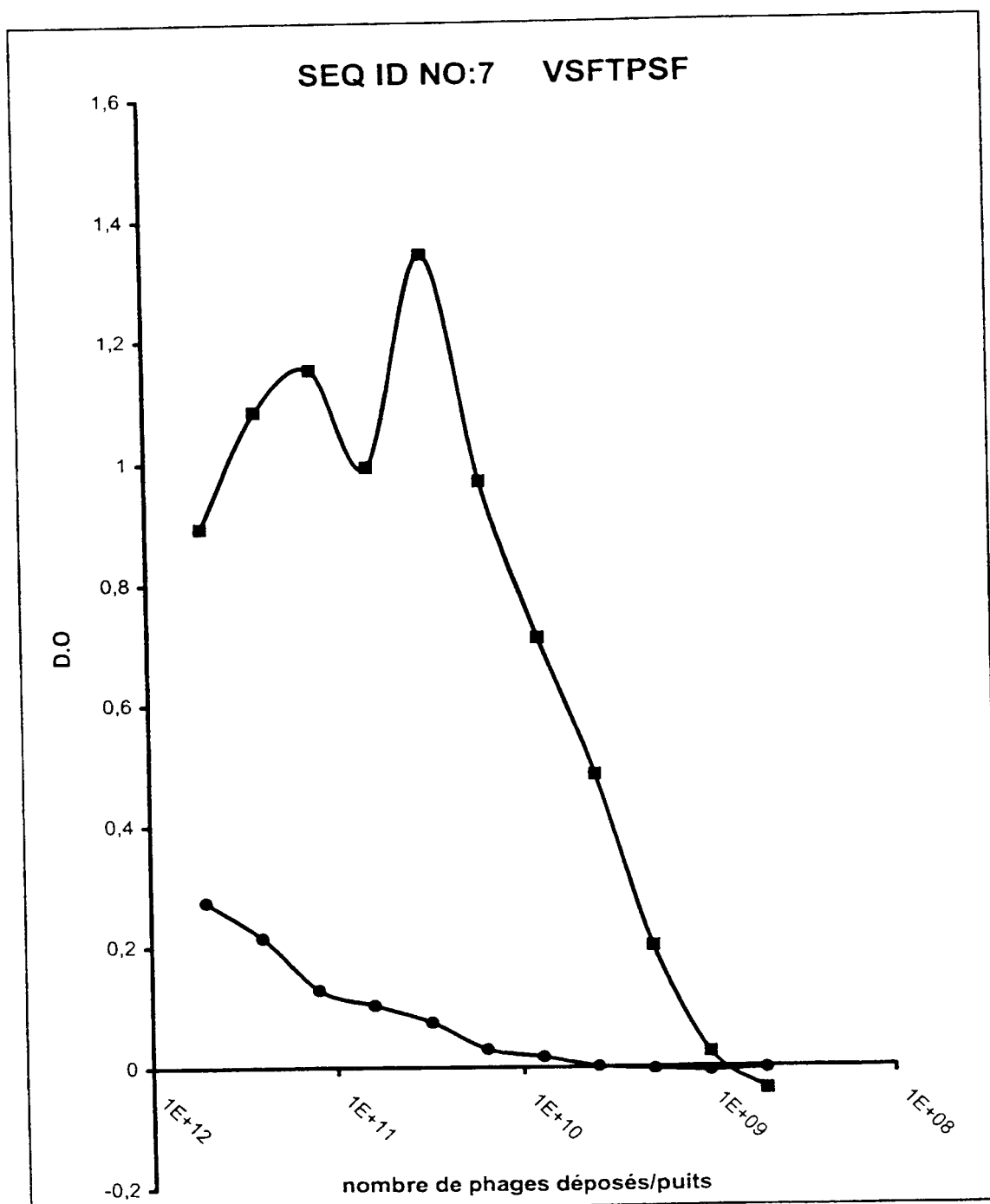
20 16) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 en tant que réactif pour le diagnostic du HIV, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.

25 17) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 en tant que réactif pour le diagnostic de la susceptibilité de sujets infectés par le virus HIV, à développer rapidement un SIDA.

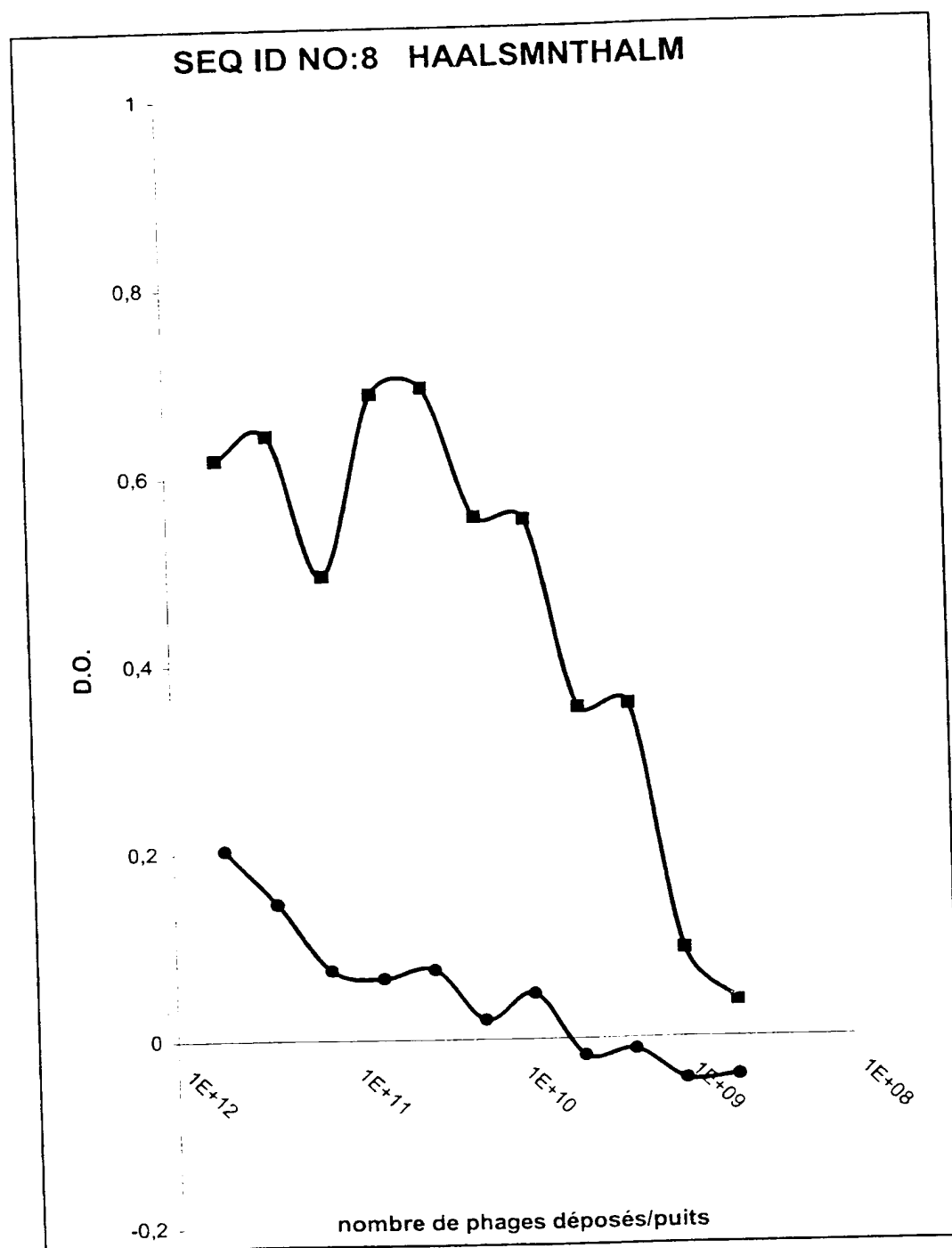
30 18) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique, destinée au traitement ou à la prévention de l'infection à HIV.

35 19) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 11 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 12 et 13 pour stimuler *in vitro* les cellules du système immunitaire d'un individu, les dites cellules étant ensuite destinées à être réinjectées dans l'organisme de l'individu après stimulation.

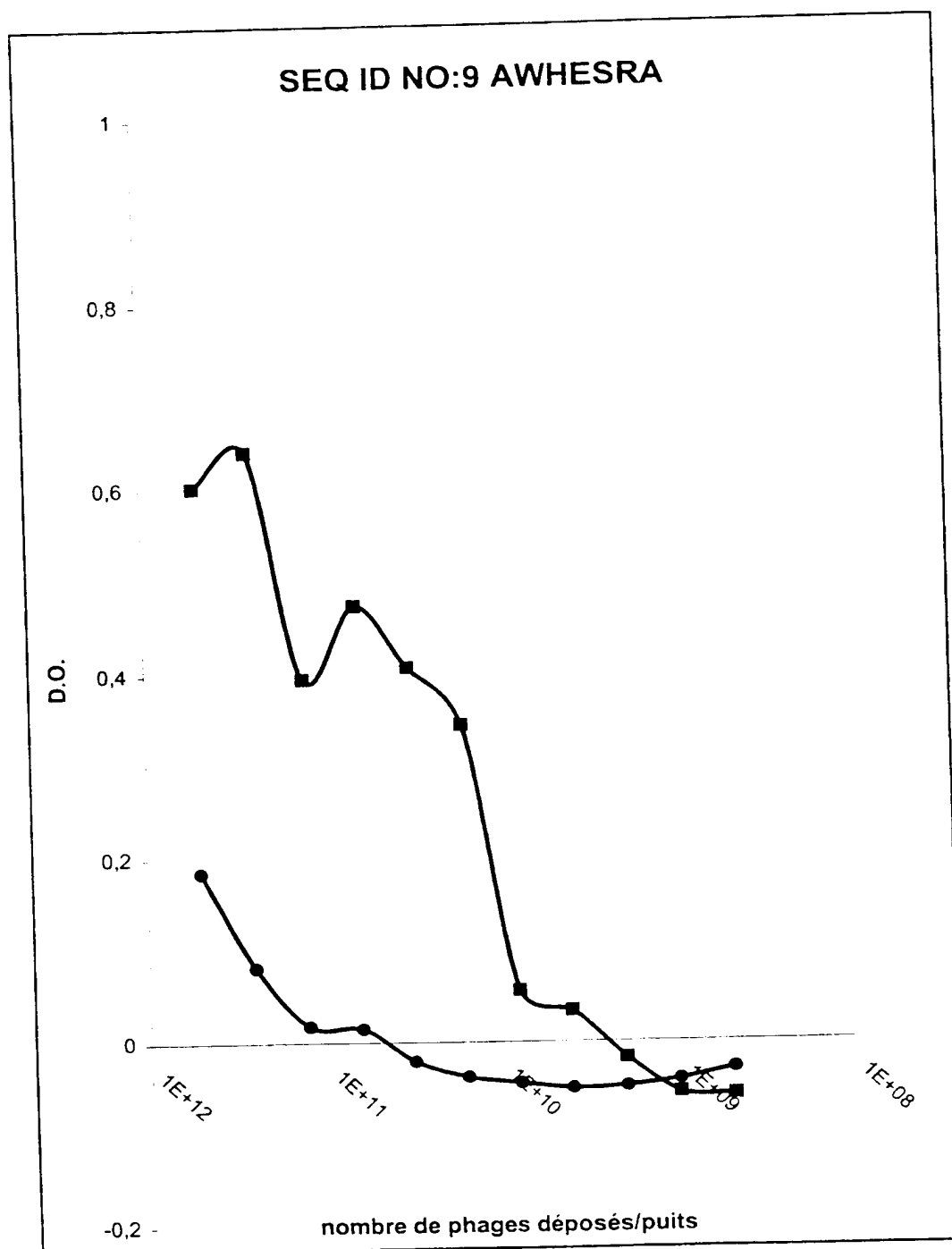




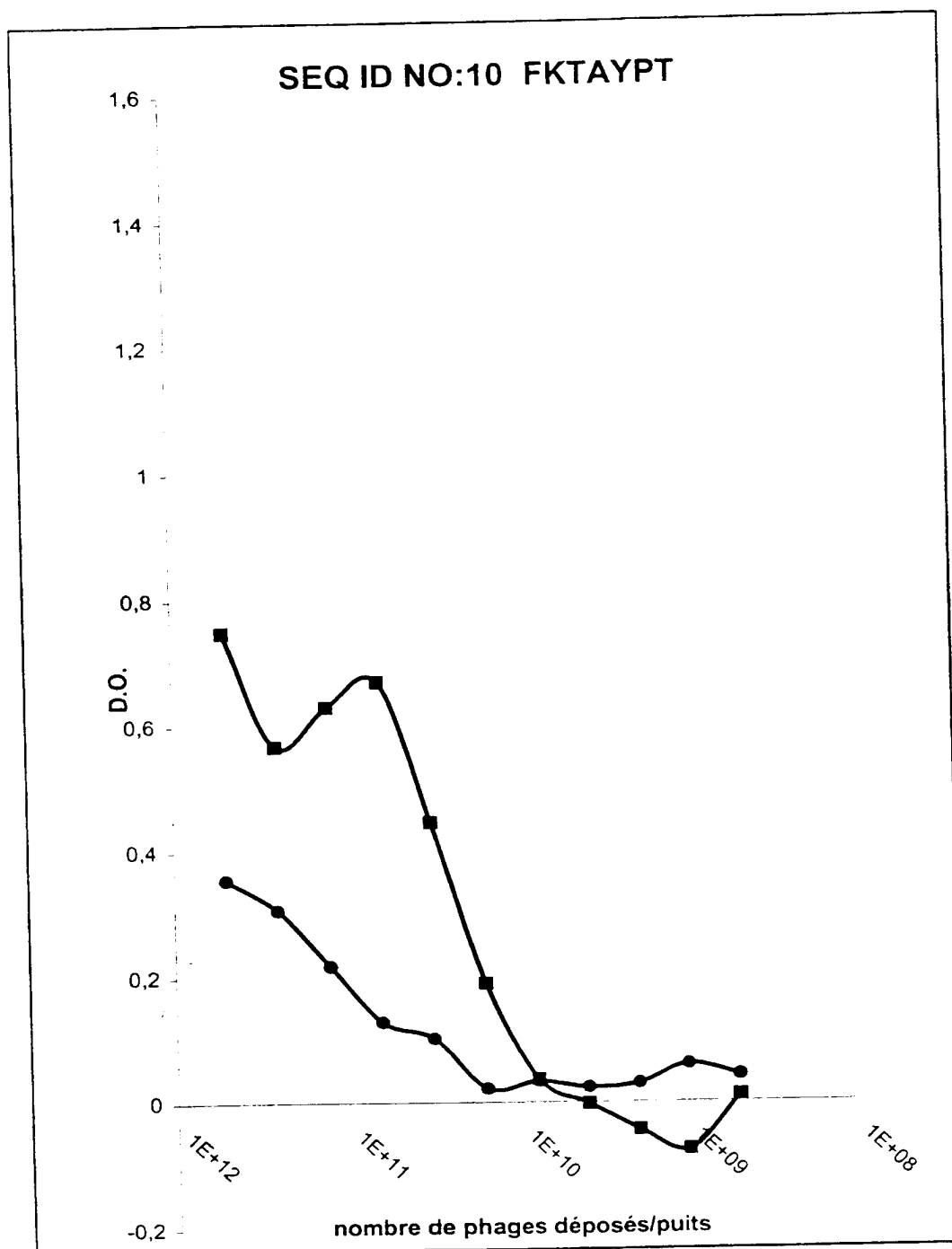




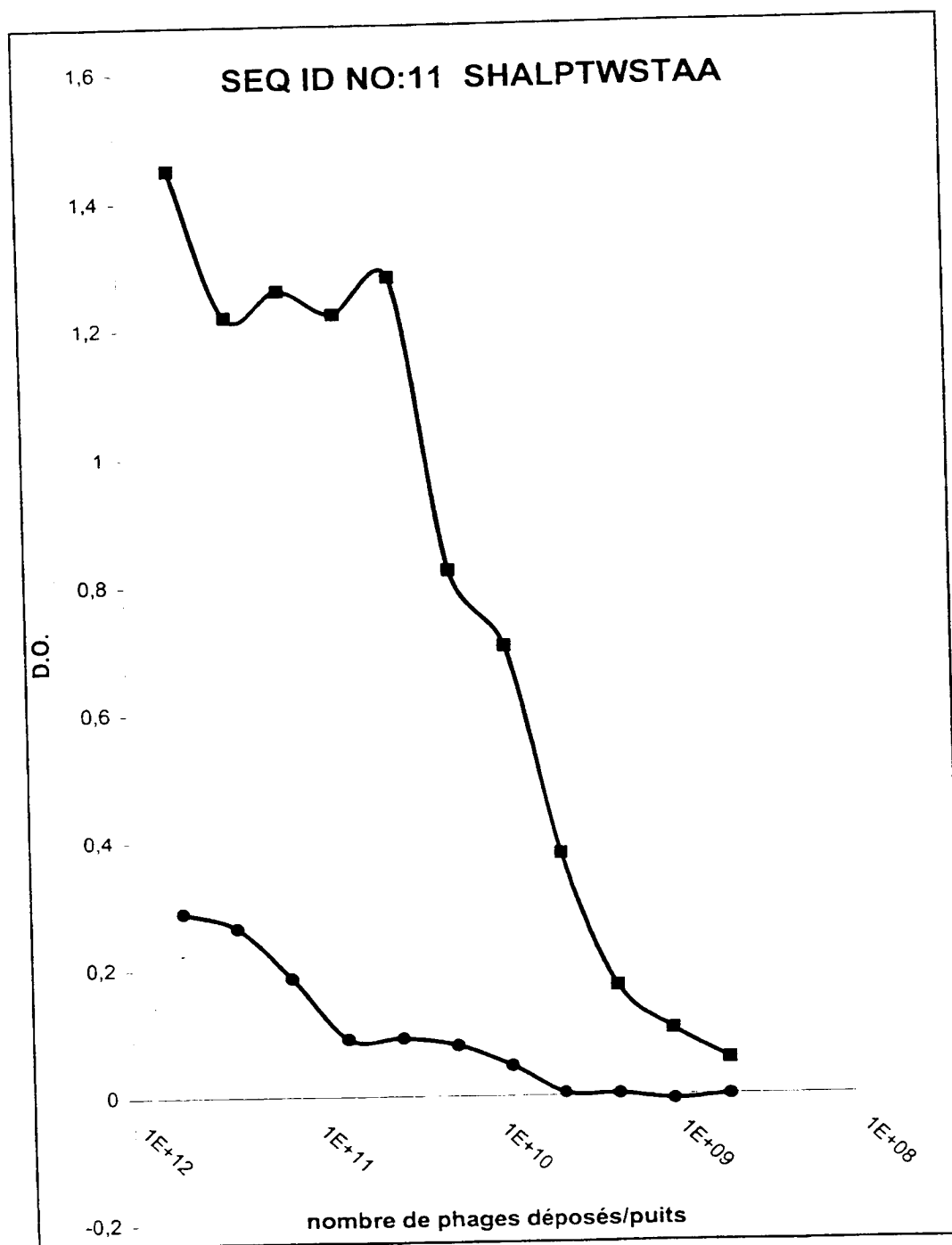














LISTE DE SEQUENCES

<110> Pasteur Mérieux Serum et Vaccins
Gros, Florent

<120> Mimotopes du HIV

<130> PM9804

<140>

<141>

<150> FR 9807598

<151> 1998-06-12

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Mimotope peptidique du HIV

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV

<400> 1

Phe Asn Leu Thr His Phe Leu

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
HIV

<400> 2

Glu Gly Trp His Ala His Thr

1

5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
HIV

<400> 3

Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr

1

5



<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 4
Ser Thr Asn Trp Met Phe Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 5
Ala Met Pro Leu Pro Tyr Thr Phe
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 6
Asp Ser His Thr Pro Gln Arg
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 7
Val Ser Phe Thr Pro Ser Phe
1 5

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:mimotope
HIV
<400> 8
His Ala Ala Leu Ser Met Asn Thr His Ala Leu Met
1 5 10



<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 9
 Ala Trp His Glu Ser Arg Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 10
 Phe Lys Thr Ala Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 11
 Ser His Ala Leu Pro Leu Thr Trp Ser Thr Ala Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:mimotope
 HIV
 <400> 12
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Gly
 1 5 10 15

 Pro Gly Lys Leu Asn Trp Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Leu Asn Trp
 20 25 30

 Met Phe Thr Gly Pro Gly Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 35 40 45

 Glu Lys Ala Met Tyr Ala
 50



<210> 13

<211> 54

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:mimotope

HIV

<400> 13

Gly	Pro	Lys	Glu	Pro	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly
1				5					10					15	

Pro	Gly	Ser	Thr	Asn	Trp	Met	Phe	Thr	Gly	Pro	Gly	Ser	Thr	Asn	Trp
			20						25					30	

Met	Phe	Thr	Gly	Pro	Gly	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Glu	Val
			35				40					45			

Glu	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala
			50		

<210> 14

<211> 54

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:mimotope

HIV

<400> 14

Gly	Pro	Lys	Glu	Pro	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly
1				5					10					15	

Pro	Gly	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Phe	Asn	Leu	Thr
			20						25					30	

His	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Glu	Val
			35				40					45			

Glu	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala
			50		



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 29339 A (CONNAUGHT LAB ;SIA CHARLES D Y (CA); CHONG PELE (CA); KLEIN MICHEL) 22 December 1994 (1994-12-22) claims; examples ---	1-11
A	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ;INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 May 1995 (1995-05-11) page 25, paragraph 3 ---	1-11
A	WO 97 18236 A (UNIV NEW YORK) 22 May 1997 (1997-05-22) claims; examples ---	1-3
A	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 October 1997 (1997-10-08) page 4, line 4 - line 12; claims; examples --- -/--	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 1999

Date of mailing of the international search report

05/10/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/FR 99/01409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	US 5 830 634 A (BRUST STEFAN ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 8, line 13 - line 16: claims; examples	1-11
P, X	WO 99 12558 A (FERTALA ANDRZEJ : ALLEGHENY UNIVERSITY OF THE HE (US); PROCKOP DARW) 18 March 1999 (1999-03-18) see Seq ID 17 claim 4	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01409

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429339	A	22-12-1994	AU 693098 B	25-06-1998
			AU 6967394 A	03-01-1995
			BR 9406821 A	26-03-1996
			CN 1128538 A	07-08-1996
			EP 0702693 A	27-03-1996
			JP 8511007 T	19-11-1996
			US 5639854 A	17-06-1997
			US 5759769 A	02-06-1998
			US 5876731 A	02-03-1999
			US 5795955 A	18-08-1998
			US 5817754 A	06-10-1998
			US 5800822 A	01-09-1998
WO 9512677	A	11-05-1995	AU 698878 B	12-11-1998
			AU 7993294 A	23-05-1995
			CA 2175692 A	11-05-1995
			EP 0725824 A	14-08-1996
WO 9718236	A	22-05-1997	US 5877155 A	02-03-1999
			CN 1202175 A	16-12-1998
			EP 0876396 A	11-11-1998
EP 0800084	A	08-10-1997	DE 19613253 A	09-10-1997
US 5830634	A	03-11-1998	DE 4405810 A	24-08-1995
			AT 173275 T	15-11-1998
			AU 697121 B	24-09-1998
			AU 1353295 A	07-09-1995
			BR 9500732 A	24-10-1995
			CA 2143163 A	24-08-1995
			DE 59504181 D	17-12-1998
			EP 0673948 A	27-09-1995
			ES 2124922 T	16-02-1999
			JP 7278189 A	24-10-1995
			NO 950668 A	24-08-1995
WO 9912558	A	18-03-1999	AU 9312598 A	29-03-1999



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Numéro internationale No

PCT/FR 99/01409

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 C12N15/63

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 29339 A (CONNAUGHT LAB ; SIA CHARLES D Y (CA); CHONG PELE (CA); KLEIN MICHEL) 22 décembre 1994 (1994-12-22) revendications; exemples ---	1-11
A	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ; INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 mai 1995 (1995-05-11) page 25, alinéa 3 ---	1-11
A	WO 97 18236 A (UNIV NEW YORK) 22 mai 1997 (1997-05-22) revendications; exemples ---	1-3
A	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 octobre 1997 (1997-10-08) page 4, ligne 4 - ligne 12; revendications: exemples ---	1-11
-/--		



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets - P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No

PCT/FR 99/01409

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
T	US 5 830 634 A (BRUST STEFAN ET AL) 3 novembre 1998 (1998-11-03) colonne 8, ligne 13 - ligne 16; revendications: exemples ---	1-11
P.X	WO 99 12558 A (FERTALA ANDRZEJ ; ALLEGHENY UNIVERSITY OF THE HE (US); PROCKOP DARW) 18 mars 1999 (1999-03-18) see Seq ID 17 revendication 4 -----	1-3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Demander internationale No

PCT/FR 99/01409

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9429339 A	22-12-1994	AU 693098 B	25-06-1998
		AU 6967394 A	03-01-1995
		BR 9406821 A	26-03-1996
		CN 1128538 A	07-08-1996
		EP 0702693 A	27-03-1996
		JP 8511007 T	19-11-1996
		US 5639854 A	17-06-1997
		US 5759769 A	02-06-1998
		US 5876731 A	02-03-1999
		US 5795955 A	18-08-1998
		US 5817754 A	06-10-1998
		US 5800822 A	01-09-1998
WO 9512677 A	11-05-1995	AU 698878 B	12-11-1998
		AU 7993294 A	23-05-1995
		CA 2175692 A	11-05-1995
		EP 0725824 A	14-08-1996
WO 9718236 A	22-05-1997	US 5877155 A	02-03-1999
		CN 1202175 A	16-12-1998
		EP 0876396 A	11-11-1998
EP 0800084 A	08-10-1997	DE 19613253 A	09-10-1997
US 5830634 A	03-11-1998	DE 4405810 A	24-08-1995
		AT 173275 T	15-11-1998
		AU 697121 B	24-09-1998
		AU 1353295 A	07-09-1995
		BR 9500732 A	24-10-1995
		CA 2143163 A	24-08-1995
		DE 59504181 D	17-12-1998
		EP 0673948 A	27-09-1995
		ES 2124922 T	16-02-1999
		JP 7278189 A	24-10-1995
		NO 950668 A	24-08-1995
WO 9912558 A	18-03-1999	AU 9312598 A	29-03-1999



PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Reference du dossier du déposant ou du mandataire PM9804PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/01409	Date du dépôt international (jour, mois, année) 14/06/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour, mois, année) 12/06/1998
Déposant PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 C12N15/63

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 29339 A (CONNAUGHT LAB ; SIA CHARLES D Y (CA); CHONG PELE (CA); KLEIN MICHEL) 22 décembre 1994 (1994-12-22) revendications; exemples ---	1-11
A	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ; INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 mai 1995 (1995-05-11) page 25, alinéa 3 ---	1-11
A	WO 97 18236 A (UNIV NEW YORK) 22 mai 1997 (1997-05-22) revendications; exemples ---	1-3
A	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 octobre 1997 (1997-10-08) page 4, ligne 4 - ligne 12; revendications; exemples ---	1-11
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
T	US 5 830 634 A (BRUST STEFAN ET AL) 3 novembre 1998 (1998-11-03) colonne 8, ligne 13 - ligne 16: revendications: exemples ---	1-11
P,X	WO 99 12558 A (FERTALA ANDRZEJ ; ALLEGHENY UNIVERSITY OF THE HE (US); PROCKOP DARW) 18 mars 1999 (1999-03-18) see Seq ID 17 revendication 4 -----	1-3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01409

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429339	A	22-12-1994	AU 693098 B	25-06-1998
			AU 6967394 A	03-01-1995
			BR 9406821 A	26-03-1996
			CN 1128538 A	07-08-1996
			EP 0702693 A	27-03-1996
			JP 8511007 T	19-11-1996
			US 5639854 A	17-06-1997
			US 5759769 A	02-06-1998
			US 5876731 A	02-03-1999
			US 5795955 A	18-08-1998
			US 5817754 A	06-10-1998
			US 5800822 A	01-09-1998
WO 9512677	A	11-05-1995	AU 698878 B	12-11-1998
			AU 7993294 A	23-05-1995
			CA 2175692 A	11-05-1995
			EP 0725824 A	14-08-1996
WO 9718236	A	22-05-1997	US 5877155 A	02-03-1999
			CN 1202175 A	16-12-1998
			EP 0876396 A	11-11-1998
EP 0800084	A	08-10-1997	DE 19613253 A	09-10-1997
US 5830634	A	03-11-1998	DE 4405810 A	24-08-1995
			AT 173275 T	15-11-1998
			AU 697121 B	24-09-1998
			AU 1353295 A	07-09-1995
			BR 9500732 A	24-10-1995
			CA 2143163 A	24-08-1995
			DE 59504181 D	17-12-1998
			EP 0673948 A	27-09-1995
			ES 2124922 T	16-02-1999
			JP 7278189 A	24-10-1995
			NO 950668 A	24-08-1995
WO 9912558	A	18-03-1999	AU 9312598 A	29-03-1999



09/19437
(56b)
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PM9804 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01409	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14 June 1999 (14.06.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 12 June 1998 (12.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/49		
Applicant AVENTIS PASTEUR		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 December 1999 (10.12.99)	Date of completion of this report 05 September 2000 (05.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01409

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments*).

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-28, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01409

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
 - ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See the Supplemental Box.



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II

The present application concerns peptides that mimic an epitope of a HIV-virus envelope antigen, and more specifically protein gp160 and which are specifically recognized by an antibody originating from a HIV positive patient belonging to the long term non-progressor group. The peptides exemplified are those from SEQ ID NOs. 1-11 and tandem constructions of these peptides which also comprise the HIV virus epitopes T-helper p24E and T1. Different products and uses all relating to the peptides in question are also claimed. The priority right for Claims 1 and 2 cannot be recognized because the antibodies come from a patient belonging to the long term non-progressor group, to which reference is not made in the priority document. Peptides with SEQ ID NOs. 1-6 are described as such in the priority document, consequently their priority is valid. SEQ ID NOs. 7-11 are not described in the priority document. Since a person skilled in the art could not deduce from the priority document in an obvious manner that the criteria for the mimicking of antigens of a specific antibody is fulfilled precisely by these respective amino acid sequences, their priority is not, therefore, valid. The same applies to SEQ ID NOs. 12-14 which differ from peptides with SEQ ID NOs. 7-9 of the priority document, owing to the presence of an additional lysine. Therefore, the following applies regarding priority:

Claims 1 and 2:	priority not valid
Claim 3:	priority valid for SEQ ID NOs. 1-6;
	priority not valid for SEQ ID NOs.
	7-11



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II

Claims 4 to 9	priority valid for SEQ ID NOS. 1-6; priority not valid for SEQ ID NOS. 7-11
Claim 10:	priority valid
Claim 11	priority not valid
Claims 12 to 19	priority valid for SEQ ID NOS. 1-6; priority not valid for SEQ ID NOS. 7-11 and SEQ ID NOS. 12-14 (Claim 11).

This creates problems regarding the novelty of the subject matter of Claim 3, as will be specified in Box V of the present communication.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01409

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See the Supplemental Box.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

As will be specified in Box V of the present communication, the inventive concept of the present application, as represented in Claims 1 and 2, does not at present appear to be novel or inventive according to the provisions of PCT Article 33(2) and (3). Therefore, the peptides and conjugates described by SEQ ID NOs. 1-14 are no longer jointly linked to a single general inventive concept by a specific technical effect. Consequently, the present application relates to 12 different inventions, that is, each claim relating to SEQ ID NOs. 1 and 14; 3 and 12; 4 and 13; as well as 2; and 5-11, respectively.

According to the provisions of PCT Rule 68.1, the examination has been carried out for the present application in its entirety.



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3 (SEQ ID 1-10), 4-19	YES
	Claims	1, 2, 3 (SEQ ID 11)	NO
Inventive step (IS)	Claims	3 (SEQ ID 1-10), 11	YES
	Claims	1, 2, 3 (SEQ ID 11), 4-9, 12-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims	19 (see separate sheet)	NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: KELLER P.M. et al.: "Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries". VIRCLOGY, 1993, vol. 193, pages 709-716

D2: WO-99/12556 A (1999-03-18).

Document D1 was not cited in the international search report. A copy of this document is attached.

The subject matter of Claims 1 and 2 is not novel under the terms of PCT Article 33(2) for the following reasons.

Document D1, page 711, abstract, page 713, Table 1, peptide derived from phage 550 discloses a mimetic peptide that specifically reacts with a monoclonal antibody raised against a HIV envelope antigen. This peptide, which mimics a conformational epitope of an antigen from said envelope does not correspond to a continuous sequence of amino acids of this antigen. This antigen is the V3 loop of protein gp120, of which gp160 is the precursor. Therefore, this antigen is also represented by gp160 (cf. Claim 2). Since at present it cannot be ruled out that this peptide



55 from D1 is also capable of reacting with a specific antibody from a HIV-virus envelope antigen which originates from an HIV patient belonging to the long term non-progressor group, D1 anticipates the novelty of Claims 1 and 2.

Therefore, the subject matter Claims 1 and 2 cannot be considered to be novel or inventive, contrary to the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

Since the priority right is not valid for SEQ ID NOs. 7-11, the subject matter of Claim 3 is not novel, contrary to the requirements of PCT Article 33(2). In fact, a peptide including SEQ ID NO. 11 is described in document D2, in the context of peptides and peptidomimetics which inhibit collagen assembly (Page 31, line 14).

The subject matter of Claims 4 to 19 is not anticipated by the prior art present in this file and is, therefore, considered to be novel under the terms of PCT Article 33(2).

Owing to objections to the novelty of Claims 1 and 2, it follows that Claims 4 to 9 and 12 to 19, in view of their dependence upon Claims 1 to 3, do not involve an inventive step, contrary to PCT Article 33(3). This is because their subject matter is obvious to a person skilled in the art, seeing that the peptides in question are available. Similarly, an inventive step according to PCT Article 33(3) cannot be recognized for Claim 3 with regard to the peptide with SEQ ID NO. 11.

The peptides from Claims 4 and 11, e.g. with SEQ ID NOs. 1-10 and 12-14 are considered to be novel (apart from SEQ ID NO. 11, see above), because no prior art document



specifically discloses these peptides, or their function as mimetic peptides of a HIV envelope antigen as described above.

Peptides 1-10 and 12-14, taken individually (see Box IV of the present report) are also considered to involve an inventive step, because no prior art document in the file suggests, in an obvious manner, that these specific peptides could be epitopes of a HIV-virus envelope antigen.

It follows that Claim 11 fulfils the requirements of PCT Article 33(3) and also Claim 3, since it refers to peptides of SEQ ID NOs. 1-10 (also see above for SEQ ID NO. 11).

The present Administration considers that the subject matter of Claim 19 is encompassed by the provisions of PCT Rule 67.1(iv). For this reason, no opinion will be given as to whether the subject matter of these claims is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)).



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The following objections relate to PCT Article 6.

Claims 1 and 2 lack the technical features for clearly defining the subject matter of these claims, contrary to the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(a). The subject matter of these claims is simply a definition of the desired result, that is, a mimetic peptide for a HIV envelope antigen (particularly gp160) specifically recognized by an antibody originating from an HIV positive patient belonging to the long term non-progressor group. A person skilled in the art receives no indication of the nature of the peptides, that is, the amino acid sequence, which meets this mimetic peptide requirement, and consequently cannot ascertain which peptides will be likely to fulfil the desired mimetic requirements.

The scope of Claim 2 is not clearly defined owing to the term "represented by gp160". Since gp160 can be cleaved into gp120 and gp41 on the HIV surface (description, page 1, lines 31 to 35), this term is subject to subjective interpretation.

Claim 3, which depends upon Claims 1 and 2 lacks clarity, contrary to the requirements of PCT Article 6, in view of the use of the term "may include". In fact, if the peptide from the claim "may" include sequences 1 to 11, this could also mean that they may not include one of said sequences. Under such circumstances, it remains completely unclear which amino acid sequence the peptide must include to fulfil the mimetic requirements defined in Claims 1 and 2.



VIII. Certain observations on the international application

Therefore, the scope of the subject matter of Claim 3 is not clearly defined or delimited. It should be noted that, in this context, if the peptide from Claim 3 does not include one of the sequences 1-11, the peptide 55 disclosed in D1 (page 713, Table 1, peptide derived from phage 55) would also anticipate the novelty of this claim.



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 12 SEP 2000

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire PM9804 PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01409	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/06/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 12/06/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/49		
Déposant PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 9 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☒ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/12/1999	Date d'achèvement du présent rapport 05 09 2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Steffen. P N° de téléphone +49 89 2399 7307 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01409

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-28 version initiale

Revendications, N°:

1-19 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☒ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01409

revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

voir feuille séparée

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a

- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :

voir feuille séparée

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01409

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3(SEQ ID 1-10),4-19 Non : Revendications 1.2.3(SEQ ID 11)
Activité inventive	Oui : Revendications 3(SEQ ID 1-10),11 Non : Revendications 1.2.3(SEQ ID 11),4-9,12-19
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-18 Non : Revendications 19(voir feuille séparée)

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée



Concernant le point II

Priorité

La présente demande a pour objet des peptides qui miment un épitope d'un antigène d'enveloppe du virus HIV, et plus spécifiquement de la protéine gp160 et qui sont spécifiquement reconnus par un anticorps provenant d'un patient séropositif appartenant au groupe des "long term non progressor". Les peptides exemplifiées sont ceux des SEQ ID NO's: 1-11 ainsi que des constructions en tandem de ces peptides, comportant également les épitopes T-helper p24E et T1 du virus HIV. Sont revendiqués également différents produits et l'utilisations qui sont toutes relatives aux peptides en question. Le droit de priorité ne peut être reconnu pour les revendications 1 et 2, à cause de la provenance de l'anticorps d'un patient appartenant au groupe des "long term non progressors", dont il n'est pas fait référence dans le document de priorité. Les peptides SEQ ID NO's 1-6 sont décrits en tant que tels dans le document de priorité, leur priorité est en conséquence valable. Les SEQ ID NO's 7-11 ne sont pas décrits dans le document de priorité. Comme l'homme de métier ne pouvait pas, à partir du document de priorité, de manière évidente déduire que le critère de mimétique d'antigène d'un anticorps spécifique est rempli justement par ces séquences respectives en acides aminés, leur priorité n'est donc pas valable. Ceci vaut également pour les SEQ ID NO's 12-14 qui diffèrent des peptides SEQ ID NO'S 7-9 du document de priorité, par la présence d'une lysine additionnelle. En conséquence, pour la priorité la figure suivante résulte:

revendications 1 et 2:	priorité non-valable
revendication 3:	priorité valable pour les SEQ ID NO's 1-6; priorité non-valable pour les SEQ ID NO's 7-11
revendications 4-9:	priorité valable pour la référence aux SEQ ID NO's 1-6; priorité non-valable pour la référence aux SEQ ID NO's 7-11
revendication 10:	priorité valable
revendication 11:	priorité non-valable
revendications 12-19:	priorité valable pour la référence aux SEQ ID NO's 1-6; priorité non-valable pour la référence aux SEQ ID NO's 7-11 et aux SEQ ID NO's 12-14 (revendication 11).

Ceci résulte dans des problèmes de nouveauté pour l'objet de la revendication 3, comme va être détaillé dans le point V de la présente communication.



Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

Comme sera détaillé dans le point V de la présente communication, le concept inventif de la présente demande, tel qu'il est représenté dans les revendications 1 et 2 ne semble pour l'instant ni être nouveau ni être inventif selon les dispositions des articles 33(2) et 33(3) PCT. En conséquence les peptides et conjugués tels qu'ils sont décrits par les SEQ ID NO's 1-14 ne sont plus liés ensemble à un concept inventif commun par un effet technique spécifique. Dès lors la présente demande concerne 12 inventions différentes à savoir les revendications à chaque fois relatives aux SEQ ID NO's 1 et 14; 3 et 12; 4 et 13; ainsi que 2; et 5-11, respectivement.

Selon les dispositions de la règle 68.1 PCT, l'examen est réalisé sur toute les parties de la présente demande.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: KELLER, P.M. et al.: "Identification of HIV Vaccine Candidate Peptides by Screening Random Phage Epitope Libraries". VIROLOGY, 1993, vol. 193, pages 709-716.
- D2: WO 99 12558 A (1999-03-18)

Le document D1 n'a pas été cité dans le rapport de recherche international. Une copie de ce document est jointe en annexe.

L'objet des revendications 1 et 2 n'est pas nouveau selon les exigences de l'article 33(2) PCT pour les raisons suivantes.



RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR99/01409

Dans le document D1 (page 711, résumé, page 713, tableau 1, peptide dérivé du phage 55) est révélé un peptide mimétique qui réagit spécifiquement avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène d'enveloppe du HIV. Ce peptide, qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de ladite enveloppe ne correspond pas à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène. Cet antigène est le V3 loop de gp120, protéine dont gp160 est le précurseur. En conséquence, cet antigène est également représenté par gp 160 (cf. revendication 2). Comme à présent, il ne peut nullement être exclus que ce peptide 55 de D1 est également capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène d'enveloppe du virus HIV, provenant d'un patient HIV positif et appartenant au groupe des "long term non progressor", D1 anticipe la nouveauté des revendications 1 et 2.

En conséquence, l'objet des revendications 1 et 2 ne peut être considéré ni comme nouveau, ni comme inventif, contrairement aux exigences des articles 33(2) et 33(3) PCT.

Comme le droit de priorité n'est pas valable pour les SEQ ID's 7-11, l'objet de la revendication 3, n'est pas nouveau contrairement aux exigences de l'article 33(2) PCT. En effet un peptide comprenant la SEQ ID NO 11 est décrit dans le document D2, dans le contexte de peptides et peptidomimétiques qui inhibent l'assemblage du collagène (page 31, ligne 14).

L'objet des revendications 4-19 n'est pas anticipé par l'art antérieur présent dans le dossier et est donc à considérer comme nouveau selon les critères de l'article 33(2) PCT.

Des objections contre la nouveauté des revendications 1 et 2 suit que les revendications 4-9 et 12-19, en ce qui concerne leur dépendance par rapport aux revendications 1-3, ne sont pas basés sur une activité inventive, contrairement à l'article 33(3) PCT, car leur objet est évident pour l'homme de métier, dès que les peptides en question ont été mis à disposition. De même, une activité inventive selon l'article 33(3) PCT ne saurait être reconnue pour la revendication 3, en ce qui concerne le peptide SEQ ID NO: 11.

Les peptides des revendications 3 et 11, e.g. avec les SEQ ID NO's 1-10 et 12-14 sont considérés comme nouveaux (donc à part la SEQ ID NO 11, voir plus haut), car aucun document d'art antérieur ne révèle spécifiquement ces peptides, ainsi que leur fonction de peptides mimétiques d'un antigène d'enveloppe de HIV comme décrit ci-dessus.



Les peptides 1-10 et 12-14, pris individuellement (voir point IV du présent rapport) sont également considérés comme basés sur une activité inventive, car aucun document d'art antérieur du dossier ne suggère de manière évidente que ces peptides spécifiques pourraient être des épitopes d'un antigène d'enveloppe du virus HIV.

Il en découle que la revendication 11 est en accord avec les critères de l'article 33(3) PCT et de même la revendication 3, lorsqu'elle réfère aux peptides des SEQ ID NO's: 1-10 (voir aussi plus haut pour SEQ ID NO: 11).

La présente Administration considère que l'objet des revendications 19 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

Les objections suivantes concernent l'article 6 PCT.

Les revendications 1 et 2 manquent de caractéristiques techniques pour définir clairement l'objet de cette revendication, contrairement aux exigences de l'article 6 PCT en combinaison avec la règle 6.3(a) PCT. Ces revendications ont pour objet seulement le définition du résultat recherché à savoir un peptide mimétique pour un antigène d'enveloppe du HIV (et notamment gp160) reconnu spécifiquement par un anticorps provenant d'un patient HIV positif du groupe des "long term non progressor". L'homme de métier ne trouve ici aucune indication quant à la nature des peptides à savoir la séquence en acides aminés, qui suffit à satisfaire cette exigence de peptide mimétique et en conséquence il ne saurait apprécier quels peptides vont être aptes à remplir les critères de mimétique désirés.

L'étendue de revendication 2, n'est pas clairement définie à cause du terme "représenté par gp160". Comme gp160 peut être clivé en gp120 et gp41 à la surface de HIV (description, page 1, lignes 31 à 35), ce terme est sujet à interprétation subjective.



Le revendication 3, qui dépend des revendications 1 et 2 manque de clarté contrairement aux exigences de l'article 6 PCT, en référence à l'emploi du terme "peut comprendre". En effet si le peptide de la revendication peut comprendre les séquences 1 à 11, cela veut aussi dire qu'il ne peut pas comprendre une des séquences 1 à 11. Or dans ce cas il reste complètement obscur qu'elle séquence en acides aminés le peptide doit comprendre pour pouvoir satisfaire les critères de mimétique tels qu'ils sont définis dans les revendications 1 et 2. Ainsi l'étendue de l'objet de la revendication 3 n'est pas clairement défini et délimité. Il est à noter, dans ce cadre, que au cas où le peptide de la revendication 3 ne comprend pas une des séquences 1-11, le peptide 55 révélé dans D1 (page 713, tableau 1, peptide dérivé du phage 55) anticiperait également la nouveauté de cette revendication.

